



UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE

Tesi di Laurea

**Studio della proteina CDKL5 wild type e dei
suoi mutanti patologici coinvolti nella
patogenesi dell' Encefalopatia Epilettica
Infantile Precoce tipo 2, una variante della
Sindrome di Rett**

Relatori

Dr. MARIO COSTA

Candidato

Dr.ssa LAURA PANCRAZI

ALESSANDRA MASALA

Anno accademico 2010-2011

*Il processo di una scoperta scientifica è, in effetti,
un continuo conflitto di meraviglie.*

Albert Einstein

*La biologia è lo studio di organismi complessi che sembrano essere stati
disegnati per uno scopo preciso. La fisica è lo studio della materia più
semplice che non ci induce a desiderare di scoprirne la forma.*

Richard Dawkins

*La mente creativa è in grado di
“pensare qualcosa che nessuno ha ancora pensato,
guardando qualcosa che ognuno vede”.*

Arthur Schopenhauer

INDICE

Riassunto.....	I
Abstract.....	V

INTRODUZIONE

1. La Sindrome di Rett: caratteri generali.....	1
1.1 Caratteristiche cliniche.....	1
1.2 La forma classica.....	2
1.3 Le forme varianti.....	5
1.4 Eziopatogenesi.....	6
2. MeCP2.....	9
2.1 Struttura della proteina.....	10
2.2 Domini di espressione.....	11
2.3 Possibili ruoli funzionali.....	13
2.4 Le mutazioni di MeCP2.....	14
2.5 Mutazioni di MeCP2 e maschi affetti da Sindrome di Rett.....	15
2.6 Dal genotipo al fenotipo.....	16
3. FOXP1.....	20
3.1 Ipotesi sul ruolo funzionale di FOXP1.....	21
3.2. Mutazioni di FOXP1 e variante congenita della Sindrome di Rett.....	23
4. CDKL5.....	24
4.1 Struttura della proteina.....	26
4.2 Localizzazione e funzione.....	27
4.3 CDKL5 e MeCP2.....	30
4.4 CDKL5 e la morfogenesi dendritica.....	32
4.5 CDKL5 e la maturazione dei pre-mRNA.....	33
4.6 Le mutazioni: dal genotipo al fenotipo.....	35

5. Spettroscopia di Correlazione della Fluorescenza (FCS): Dalla FRAP (<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>) alla RICS (<i>Raster Image Correlation Spectroscopy</i>).....	39
5.1 FRAP (<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>).....	42
5.2 RICS (<i>Raster Image Correlation Spectroscopy</i>).....	45
 SCOPO DELLA TESI.....	 48
 MATERIALI E METODI	
1. Colture cellulari.....	50
2. Immunocitochimica.....	53
3. Preparazione delle cellule per gli esperimenti di FRAP e RICS.....	56
4. Microscopia a fluorescenza: Microscopio Confocale.....	58
5. Vettori.....	63
6. Realizzazione del vettore pEGFPN1-hCDKL5 ₁₁₅	67
 RISULTATI	
1. Analisi della localizzazione di hCDKL5 endogena in fibroblasti murini.....	88
2. Produzione del vettore per l'espressione della proteina di fusione hCDKL5₁₁₅-GFP in pEGFPN1.....	90
3. Analisi della localizzazione delle proteine di fusione GFP-hCDKL5...	92
3.1 Localizzazione di GFP-hCDKL5 ₁₁₅	92
3.2 Localizzazione di hCDKL5 ₁₁₅ -GFP.....	94
3.3 Localizzazione della proteina GFP-hCDKL5 ₁₀₇	96
3.4 Piccole vescicole citoplasmatiche: colorazione con LysoTracker.....	98
3.5 Analisi della localizzazione dei mutanti puntiformi patologici C152F e R175S.....	100
3.6 Analisi della localizzazione dei mutanti troncati ΔC525 e ΔC781.....	101

3.7 Conclusioni sulla localizzazione delle proteine di fusione GFP-hCDKL5.....	102
4. Analisi della dinamica molecolare di hCDKL5 in cellule in coltura tramite FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).....	105
4.1 Dinamica molecolare di hCDKL5 ₁₁₅ : confronto fra GFP-hCDL5 ₁₁₅ e hCDKL5 ₁₁₅ -GFP.....	105
4.2 Dinamica molecolare di GFP-hCDKL5 ₁₀₇	110
5. Analisi di RICS (Raster Image Correlation Spectroscopy).....	111
5.1 GFP-hCDKL5 ₁₁₅ : analisi del coefficiente di diffusione nel nucleo e nel citoplasma.....	111
5.2 GFP-hCDKL5 Δ C525 e Δ C781: l'assenza dell'estremità carbossi-terminale altera il pattern di diffusione della proteina.....	113
5.3 GFP-hCDKL5 C152F e GFP-hCDKL5 R175S: mutazioni sul dominio chinamico alterano la diffusività a livello dei nucleoli.....	115
5.4 Confronto globale dei coefficienti di diffusione D nelle proteine GFP-hCDKL5 ₁₁₅ , GFP-hCDKL5 Δ C525, GFP-hCDKL5 Δ C781, GFP-hCDKL5 C152F e GFP-hCDKL5 R175S.....	120
DISCUSSIONE.....	126
1. hCDKL5 è presente sia nel nucleo che nel citoplasma.....	128
2. Le proteine GFP-hCDKL5 e hCDKL5-GFP hanno localizzazioni e cinetiche analoghe nel modello cellulare NIH 3T3.....	130
3. hCDKL5 svolge un ruolo importante nel citoplasma.....	131
4. La forma wild type alternativa hCDKL5₁₀₇ mostra una cinetica differente rispetto alla forma da 115 kDa	133
5. Il dominio carbossi termianle influenza la localizzazione subcellulare di hCDKL5.....	134
6. Alterazioni del dominio chinamico causano una mislocalizzazione di hCDKL5 nei nucleoli.....	138

BIBLIOGRAFIA.....	142
RINGRAZIAMENTI.....	151

Riassunto

La Sindrome di Rett (MIM 312750) è un disordine genetico del neurosviluppo che colpisce prevalentemente le bambine e ne rappresenta una delle cause più comuni di ritardo mentale (incidenza di 1 ogni 10000). Circa il 99% dei casi è di tipo sporadico, e solamente l'1% dei casi è di tipo familiare (Schanen *et al*, 1997). Oltre alla forma classica dovuta a mutazioni sul gene *MeCP2* (Methyl-CpG-binding protein 2), riscontrate nell'85% dei pazienti, (Amir *et al*, 1999), sono state identificate altre due forme dovute a mutazioni sui geni *Cdkl5* (cyclin-dependent kinase-like 5) e *FoxG1* (Forkhead box G1). *MeCP2* e *Cdkl5* sono entrambi localizzati sul cromosoma X, mentre *FoxG1* si trova sul cromosoma 14, di conseguenza la patologia colpisce prevalentemente il sesso femminile.

Le bambine affette dalla forma classica nascono apparentemente sane ed il loro sviluppo nei primi 6–18 mesi non presenta particolari difetti. Nei mesi successivi (intorno ai due anni), segue un periodo di arresto dello sviluppo mentale, con microcefalia, blocco della crescita e ipotonia, che conduce ad una fase di regressione, in cui le pazienti acquisiscono un comportamento di tipo autistico. Successivamente iniziano a comparire i primi disordini motori: perdita della coordinazione, aprassia, atassia e movimenti stereotipati delle mani. Frequenti sono anche i disturbi a carico dell'apparato respiratorio, i problemi posturali (rigidità, scoliosi e distonia), i disturbi delle funzioni autonome (costipazione, piedi cianotici, disfunzioni orofaringee) e quelli cardiaci (tachicardia e prolungamento dell'intervallo QT). I disordini comportamentali seguono la regressione mentale, e includono crisi di pianto, umore tendente al depresso, episodi di crisi di panico. Infine, in alcune forme compaiono crisi epilettiche di tipo tonico-clonico.

CDKL5 (cyclin-dependent kinase-like 5), è un gene che mappa nella regione p22 del cromosoma X, con elevata omologia di sequenza per i geni delle MAP chinasi e delle chinasi-ciclina dipendenti (Montini *et al*, 1998). Il gene è composto da 23 esoni e codifica per una serina-treonina chinasi di cui esistono 4 forme di splicing alternativo:

1. L'isoforma I e l'isoforma II dell' RNA messaggero differiscono per la presenza nell'isoforma II degli esoni facoltativi 1a e 1b situati nella 5' UTR, e codificano entrambi per la stessa proteina di 115 kDa, lunga 1030 amminoacidi.
2. L'isoforma III (isolata nel 2011) è una forma di splicing alternativo che include l'esone 16b; l' RNA messaggero è composto da 23 esoni e codifica per una proteina di 120 kDa, (più lunga di 41 amminoacidi al C-terminale) che risulta complessivamente formata di 1071 residui (Fichou *et al*, 2011).
3. L'isoforma IV, anch'essa isolata nel 2011, è una forma di splicing alternativo che termina con l'introne 18. Possiede quindi un'estremità C-terminale più corta, è formata di 960 residui ed ha un peso molecolare di 107 kDa. (Williamson, Giudici *et al*. 2011).

Le isoforme I e II sono espresse, nel topo, a livello del muscolo scheletrico, del cervelletto, della corteccia, dell'ippocampo, dei bulbi olfattivi e, in minor misura, nel rene, nel polmone e nel cuore; sono assenti invece nel fegato. Le isoforme III e IV sono espresse soprattutto nel SNC; si ritrovano infatti quasi esclusivamente nel cervelletto, nella corteccia, nell'ippocampo e nei bulbi olfattivi, con bassissimi livelli di espressione anche nel fegato; sono assenti negli altri tessuti (Fichou *et al*, 2011).

L' Encefalopatia Epilettica Infantile Precoce tipo 2, nota anche come Variante di Hanefeld o come Sindrome da Spasmi Infantili dominante

legata all'X di tipo 2 è una variante della Sindrome di Rett causata da mutazioni su *Cdkl5*. In questa variante, oltre alle caratteristiche della forma classica, sono spesso presenti episodi di crisi epilettiche e spasmi infantili ad esordio molto precoce. La maggioranza dei pazienti è di sesso femminile, con quadri variabili di gravità a causa del fenomeno di inattivazione dell'X; tuttavia sono noti anche casi, sebbene piuttosto rari, di individui di sesso maschile affetti dalla patologia.

Le mutazioni patologiche più frequenti sono le puntiformi C152F (G455T), R175S (A525T) (Tao *et al*, 2004) e A40V (C119T) (Rosas-Vargas *et al*, 2008), tutte localizzate nel dominio chinasi della proteina. Una delle mutazioni patologiche che porta alla formazione di una proteina trunca è la S781fsx783, una mutazione frameshift che porta alla traduzione di una proteina di soli 781 residui (Δ C781), con un'estremità carbossi-terminale più corta.

Ad oggi, non è noto il ruolo fisiologico di CDKL5, e pochi studi sono presenti in letteratura riguardo la sua localizzazione intracellulare, l'affinità per la cromatina ed il ruolo delle mutazioni nella patogenesi della malattia.

Lo scopo della mia tesi è quello di analizzare, in linee cellulari, la localizzazione subcellulare, il profilo di diffusione e l'affinità per la cromatina di hCDKL5 wild type (nelle isoforme da 115 kDa e da 107 kDa), comparandoli a quelli delle forme patologiche C152F, R175S, e delle forme troncate all'estremità carbossi-terminale Δ C525 (mutante di sintesi) e Δ C781. L'obiettivo ultimo è quello di formulare delle ipotesi sul ruolo di queste mutazioni nella patologia e di individuare domini importanti nella funzionalità della proteina.

A questo scopo, sono state effettuate delle trasfezioni transienti su cellule NIH-3T3 con dei costrutti in cui la Green Fluorescent Protein (GFP) è fusa in frame all'estremità ammino terminale del cDNA di *Cdkl5* wild type e dei suddetti mutanti. Una volta appurata la localizzazione subcellulare, sono state effettuate delle misure di FRAP e di RICS per valutare la cinetica di spostamento tra il nucleo e il citoplasma e il profilo di diffusività della proteina. Grazie all'impiego di queste tecniche, è stato possibile formulare delle ipotesi sul ruolo funzionale di CDKL5, e attraverso l'analisi delle alterazioni osservate nelle forme mutanti, sono stati evidenziati dei domini importanti per il corretto funzionamento della proteina.

Abstract

Rett Syndrome (MIM 312750) is a genetically-based neurodevelopmental disorder that occurs almost exclusively in females; it represents one of the most frequent causes of mental retardation (1 in 10000). Among these, about the 99% of cases result to be sporadic, whereas familial recurrences of Rett Syndrome comprise only approximately 1% of the total reported cases (Schanen *et al*, 1997). Besides the classical form, caused by mutations in *MeCP2* gene (Methyl-CpG-binding protein 2), which have been found in the 85% of the patients (Amir *et al*, 1999), more recently two other forms of the disease have been identified, linked to mutations on *FOXP1* (Forkhead box G1) and *CDKL5* (cyclin-dependent kinase-like 5) genes. *MeCP2* and *Cdkl5* localize both on X chromosome, while *FoxG1* gene is localized on chromosome 14. For that reason the disease affects more girls than boys. Girls affected by the classical form appear healthy at birth, and appear to develop normally up to 6-18 months of age. In the second year of life, it occurs a period of developmental stagnation, accompanied by microcephaly, growth deceleration and hypotonia, that leads to a regression phase, during which patients develop an autistic-like behavior. After that, patients start showing motor disorders, like loss of coordination, apraxia, ataxia, and, during this time, they generally develop stereotypic movements instead of propuseful use of hands. Respiratory abnormalities, postural problems (like rigidity, scoliosis and dystonia), autonomic disfunctions (constipation, cold blue feet, orofaringeal disorders) and cardiac problems (tachycardia and extension of QT interval) are also frequent. Behavioral alterations follow mental

regression, and includes crying, low mood and panic attacks. Finally, in some variant forms patients develop tonic-clonic seizures.

CDKL5 (cyclin-dependent kinase-like 5) gene maps on p22 region of X chromosome, with an high homology with both MAP kinases and Cyclin-dependent kinase genes (Montini *et al*, 1998). The gene is composed by 23 exons, and it encodes for a serine-threonine kinase. 4 splice variant have been discovered:

1. Isoform I and isoform II of mRNA differ because of the presence, in isoform II, of two additional exons, exons Ia and Ib, located on 5' UTR. They both encode for the same 115 kDa and 1030 amminoacids protein;
2. Isoform III (isolated in 2011) is a splice variant that includes the alternative exon 16b; the mRNA is composed by 23 exons, and encodes a 120 kDa protein, 41 amminoacids longer than the 115 kDa protein. This protein contains 1071 residues (Fichou *et al*, 2011).
3. Isoform IV, isolated in 2011, is a splice variant that ends with intron 18. The protein has a shorter C-terminus, contains 960 residues and has a molecular weight of 107 kDa (Williamson, Giudici *et al*. 2011).

Isoform I and isoform II are expressed, in mouse, in skeletal muscle, cerebellum, cortex, hippocampus, olfactory bulbs and, at lower levels, in kidney, lung and heart; their expression is not detectable in the liver. Isoform III and IV are expressed at high levels in the SNC, in particular in cerebellum, cortex, hippocampus and olfactory bulbs and also in liver at very low levels; they are not expressed in all the other tissues.

Early Infantile Epileptic Encephalopathy-2, also known as Hanefeld Variant or as X-Linked Dominant Infantile Spasm Syndrome-2, is a variant form of Rett Syndrome caused by mutations on *CDKL5* gene. In this variant form patients shows all the symptoms of the classical form, but, in

addition, they frequently developed seizures and infantile spasms at early onset. The majority of patients are females, and they show a dramatically variable spectrum of symptoms because of the X-inactivation phenomenon; for this reason the seriousness of symptoms differs from case to case. By the way, in some cases, males can develop the disease too, because of the alterations of X chromosome ploidy number. C152F (G455T) , R175S (A525T) and A40V (C119T) are the most frequent missense mutations that occurs in patients affected by Rett Syndrome. The most common truncating mutation is the frameshift mutation S781fsx783, that leads to the production of a protein truncated on aminoacid 781.

The physiological role of hCDKL5 is still unknown. In literature there are only few studies that illustrate the subcellular localization of hCDKL5, the affinity for chromatin and enlight the role of mutations in the pathogenesis of the disease.

The aim of this paper is to analyze the subcellular localization, the diffusive profile and the affinity for chromatin of wild type hCDKL5 (both 115 and 107 kDa) and of mutant forms C152F, R175S, Δ C525 and Δ C781 in cultured cells. The purpose is to formulate some hypothesis about the functional role of these mutations in the pathogenesis of the disease. We performed transient expression mediated by transfection on NIH 3T3 cells, using GFP (Green Fluorescent Protein)-tagged proteins. We enlightened the subcellular localization, and then we performed FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) and RICS (Raster Image Correlation Spectroscopy) experiments to evaluate the kinetics of the shuttling between the nucleus and the cytoplasm and the diffusive profile of wild type and mutant proteins.

Thanks to these experiments, we formulated some hypothesis about the possible functional role of hCDKL5 and we found important domains that are basic to the correct functionality of the protein.

INTRODUZIONE

1. La Sindrome di Rett: caratteri generali

La Sindrome di Rett (OMIM 312750) è un disordine progressivo del neurosviluppo, che colpisce bambini tra il primo e il secondo anno di età, con un'incidenza di 1 su 10000. Rappresenta la seconda causa di ritardo mentale infantile dopo la Sindrome di Down. Colpisce prevalentemente le bambine, ma sono noti anche casi di individui di sesso maschile affetti da tale patologia. Le prime descrizioni di bambine affette dalla Sindrome di Rett risalgono al 1966, anno in cui il Dr. Andreas Rett osservò alcuni dei sintomi caratteristici in due bambine nella sua clinica pediatrica a Vienna: le bambine mostravano movimenti stereotipati delle mani, con una insistente tendenza a torcerle e strizzarle in modo ripetitivo. Partendo da quella prima osservazione, il Dr. Rett individuò e descrisse i medesimi sintomi in altre 22 bambine (Rett, 1966). Fu però solo 17 anni dopo che la comunità scientifica riconobbe la patologia, in seguito alla descrizione (in lingua inglese) di 35 casi da parte del Dr. Bengt Hagberg, neurologo svedese, e dei suoi colleghi, di bambine con sintomi caratteristici, molto simili a quelli osservati dal Dr. Rett (Goldberg, Geltman et al. 1983).

1.1. Caratteristiche cliniche

La Sindrome di Rett è una patologia complessa e di difficile identificazione, data l'estrema complessità e variabilità del quadro sintomatico, sia in termini di gravità, che in termini di periodo d'esordio. I primi criteri diagnostici ufficiali per la forma classica sono stati stabiliti dalla Classificazione di Vienna nel 1984; questi sono stati aggiornati nel

corso del tempo in seguito alla scoperta di forme atipiche della Sindrome di Rett, che ha posto la necessità di elaborare una strategia diagnostica più accurata. Una prima guida diagnostica comprendente anche i criteri per le forme varianti è stata proposta da Hagberg and Skjeldal nel 1994. In questo caso, la diagnosi viene effettuata seguendo un procedimento di inclusione e esclusione di specifiche caratteristiche sintomatiche (Hagberg and Skjeldal 1994). Il modello è stato successivamente revisionato dagli stessi autori nel 2002, e poi nel 2010 da Neul e colleghi (Neul, Kaufmann et al. 2010) e da Percy e colleghi (Percy, Neul et al. 2010). La diagnosi sulla base dei sintomi viene poi validata dall'analisi di eventuali mutazioni sui geni coinvolti nella patogenesi della Sindrome di Rett.

1.2. La forma classica

Nella forma classica la maggior parte dei pazienti mostra normale sviluppo fisico, motorio e cognitivo nei primi 6-18 mesi di vita. La circonferenza cranica alla nascita è nella norma, e non è infrequente che i bambini imparino a camminare e parlare prima della comparsa dei primi sintomi. Il sintomo che accompagna l'esordio della patologia è il rallentamento della crescita: questo coinvolge dapprima il cervello, con la comparsa di microcefalia a partire dal secondo anno di vita. In seguito, il rallentamento della crescita investe il resto del corpo, con perdita di peso e ipotonia muscolare, che porta i pazienti ad assumere una postura scorretta. A questi sintomi si accompagna la comparsa di un comportamento di tipo autistico, che si dimostra in una perdita d'interesse per l'ambiente circostante, in una diminuzione o scomparsa totale dell'interazione verbale, talvolta accompagnati da irritabilità e

atteggiamenti autolesionisti. Spesso sono presenti ipersensibilità ai suoni, apatia, accompagnati dalla perdita del contatto visivo (il bambino non guarda negli occhi il suo interlocutore e ha uno sguardo inespressivo) e disturbi del sonno (Nomura 2005). Con il progredire della malattia, i bambini perdono l'uso finalizzato delle mani, e a questo sostituiscono movimenti stereotipati e ripetitivi (*wringing, washing, clapping*). I sintomi motori sono una diretta conseguenza del deterioramento celebrale: si assiste ad una perdita progressiva della coordinazione nei movimenti, con atassia e aprassia. Ai sintomi motori si aggiungono anche sintomi vegetativi, dipendenti da alterazioni del sistema nervoso autonomo. Tra questi, molti riguardano il sistema respiratorio, con iperventilazione, tendenza a trattenere il respiro, aerofagia e apnee. Sono spesso presenti anche costipazione, disfunzioni orofaringee, problemi cardiaci, come tachicardia o bradicardia e prolungamento dell'intervallo QT. Molti pazienti soffrono di alterazioni del microcircolo, che comportano problemi circolatori nelle estremità, soprattutto nei piedi (*Cold blue feet*).

Dopo una fase di rapido e progressivo deterioramento delle funzioni cognitive e motorie segue un periodo, intorno al terzo anno di vita, di stasi e consolidamento dei sintomi, che non tendono a peggiorare ulteriormente. Compaiono però sintomi come scoliosi, rigidità e distonia, che peggiorano a partire dal decimo anno di vita, e si consolidano le alterazioni del comportamento. I bambini assumono la tendenza a digrignare i denti, più spesso durante il sonno, manifestano crisi di riso o di pianto apparentemente immotivate e mostrano sintomi ansiosi, uniti ad un umore tendenzialmente depresso. I sintomi raggiungono un plateau al completamento dello sviluppo fisico, e i pazienti possono vivere anche fino a 70 anni, sebbene nell'ultima fase possano comparire altre alterazioni

(come ad esempio sintomi parkinsoniani). Sebbene non sussistano evidenti alterazioni dell'appetito, la maggior parte dei pazienti è sottopeso (Chahrour and Zoghbi 2007).

Uno dei sintomi più gravi e debilitanti della Sindrome di Rett è rappresentato dalle crisi epilettiche. Il quadro patologico è variabile, ed oscilla da condizioni che rispondono efficacemente alle terapie a situazioni intrattabili e profondamente debilitanti. Le forme più comuni sono le crisi parziali complesse, quelle tonico-cloniche, quelle toniche e quelle miocloniche. L'epilessia è uno degli aspetti che più compromette la qualità della vita delle pazienti, riducendo ulteriormente la capacità di interazione sociale. Le crisi si riducono, talvolta fino a scomparire, dopo i 40 anni (Steffenburg, Hagberg et al. 2001).

La riduzione del volume cerebrale è presente nella maggioranza dei casi; alla microcefalia si accompagna un aumento della densità cellulare a carico dei neuroni corticali, dell'ipotalamo e dell'ippocampo (Bauman, Kemper et al. 1995). Si osserva anche una diminuzione nell'arborizzazione dendritica delle cellule piramidali della corteccia frontale e del subiculum (Armstrong, Dunn et al. 1995) e una diminuzione nella densità delle spine dendritiche nei neuroni piramidali corticali, un tratto caratteristico anche di altre malattie del neurosviluppo, come la Sindrome di Down, l'Autismo, la Sindrome di Angelman e la Sindrome dell'X fragile.

Infine, analisi autoradografiche di cervelli autoptici di pazienti affetti hanno messo in evidenza alterazioni nella densità di recettori di tipo eccitatorio del glutammato NMDA, AMPA, kainato e di quelli metabotropici, come anche dei recettori inibitori per il GABA (Blue, Naidu et al. 1999).

1.3. Le forme varianti

Oltre alla forma classica, sono state descritte numerose forme varianti della Sindrome di Rett, differenti per caratteristiche cliniche, età d'esordio e severità della condizione. Tra le forme meno gravi, sono state descritte la forma *con regressione tardiva* e la "*forma frusta*".

La *forma con regressione tardiva* è ancora dibattuta e non completamente accettata dalla comunità scientifica. Descritta per la prima volta da Alberga e colleghi nel 1994, è caratterizzata da un ritardo nell'esordio dei sintomi (quali la regressione del linguaggio e dei sintomi motori). La circonferenza cranica è generalmente nella norma (Hagberg and Skjeldal 1994).

La "*forma frusta*" è caratterizzata ad un esordio più tardivo rispetto alla forma classica. La regressione inizia tra il primo e il terzo anno di vita, e alcuni sintomi sono attenuati: l'uso delle mani è generalmente preservato, e i movimenti stereotipati sono di minima intensità.

Un'altra forma relativamente meno grave della Sindrome di Rett è la *Variante di Zappella*, denominata anche *Preserved Speech Variant* (PSV). I pazienti affetti da questa variante conservano l'abilità di formulare delle frasi, anche se non necessariamente di senso compiuto. Mostrano una migliorata capacità di utilizzare la mani in modo finalizzato, e la circonferenza cranica è nella norma. Sono generalmente sovrappeso, contrariamente a quanto accade ai bambini affetti dalla forma classica, e la maggior parte presenta una marcata cifosi della colonna (Zappella, Meloni et al. 2001).

Tra le forme più severe è descritta la **Forma congenita**, in cui manca il periodo di normale sviluppo nei primi sei mesi di vita tipico della forma classica; la regressione inizia ancor più precocemente, dal primo mese dopo la nascita.

Infine, esiste una **Variante con crisi epilettiche ad esordio precoce**, ove sono presenti tutti i sintomi della forma classica, ma la crisi epilettiche compaiono già dai primissimi mesi di vita, e sono spesso debilitanti e difficilmente trattabili. Questa variante è anche nota col nome di Encefalopatia Epilettica Infantile Precoce tipo 2.

1.4. Eziopatogenesi

La Sindrome di Rett colpisce quasi esclusivamente il sesso femminile, e difatti ancor prima della scoperta dei loci coinvolti, è stato proposto un modello di ereditarietà legata al cromosoma X di tipo dominante (Journel, Melki et al. 1990), (Hagberg, Aicardi et al. 1983). Secondo tale modello, le donne colpite sarebbero quindi eterozigoti per l'allele mutante, mentre nei maschi la mutazione in emizigosi non sarebbe compatibile con la vita. Secondo Thomas le mutazioni avverrebbero prevalentemente nella linea germinale maschile, mentre il tasso mutazionale nella linea germinale femminile sarebbe di molto inferiore. Il mosaicismo della linea germinale maschile fornisce una spiegazione alternativa alla quasi totale assenza di maschi affetti e allo sbilanciamento tra femmine affette e maschi affetti (Thomas 1996).

Circa il 99% dei casi di Sindrome di Rett sono di tipo sporadico, causate da mutazioni *de novo* che incorrono nella linea germinale dei genitori, pertanto l'identificazione dei loci coinvolti è stata particolarmente

complessa (Schanen, Dahle et al. 1997). La scoperta del primo locus sul cromosoma X correlato alla Sindrome di Rett è stata possibile grazie allo studio dei casi di Rett familiare. Nel 1990 Journal e colleghi hanno identificato, in una bambina affetta da Sindrome di Rett, una traslocazione reciproca tra il braccio corto del cromosoma X e il braccio corto del cromosoma 22 (t(X;22)(p11.22;p11)). Questa traslocazione ha suggerito che il locus coinvolto nella patogenesi della Sindrome di Rett fosse sul braccio corto del cromosoma X. La stessa traslocazione era presente nella madre asintomatica e nella sorella affetta da un disordine neurologico compatibile con la “forma frusta” della Rett (Journal, Melki et al. 1990). Gli studi successivi hanno portato a restringere la regione candidata fino a quando, nel 1998, Xiang e colleghi, attraverso un procedimento di mappaggio ad esclusione, hanno identificato il locus Xq28 come più probabile candidato a contenere il gene causa della Sindrome di Rett (Xiang, Zhang et al. 1998). Difatti, il primo gene coinvolto nella patogenesi della Sindrome di Rett ad essere scoperto è stato *MeCP2* (*Methyl-CpG-binding Protein 2*), localizzato sul cromosoma X al locus Xq28 (Amir, Van den Veyver et al. 1999). Attualmente sono note più di 300 alterazioni del gene, che comprendono mutazioni a singolo nucleotide di tipo missenso, nonsense e frameshift, e grosse alterazioni, come delezioni che interessano anche interi esoni. Le mutazioni del gene *MeCP2* sono la causa principale della *forma classica* della Sindrome di Rett (OMIM 312750).

Nel 2004 è stato identificato, al locus Xp22.13, il secondo gene correlato alla patogenesi della Sindrome di Rett, il gene *CDKL5* (*Cyclin Dependent Kinase Like 5*), codificante per una serina-treonina chinasi. Sono note numerose alterazioni della sequenza genica di *CDKL5* ritrovate in pazienti affetti dalla forma atipica *con crisi epilettiche ad esordio precoce*, nota anche

come *Variante di Hanefeld* o Encefalopatia Epilettica Infantile Precoce tipo 2 (OMIM 300672) (Weaving, Christodoulou et al. 2004).

Il terzo gene coinvolto nel meccanismo patogenetico che porta alla Sindrome di Rett è *FOXP1* (*Forkhead Box G1*), che codifica per un fattore di trascrizione con funzione di repressore. Nel 2008 Ariani e colleghi hanno identificato due mutazioni sul gene di FoxG1 in due pazienti non imparentate, entrambe affette dalla Variante congenita della Sindrome di Rett (Ariani, Hayek et al. 2008).

2. MeCP2

Il gene *Mecp2* è situato sul cromosoma X, al locus Xq28, posto tra il gene per la chinasi associata al recettore dell'interleuchina 2 (IRAK) e il gene dell'opsina rossa (RCP), in una regione di elevata sintonia con il genoma di topo. Il gene si estende per circa 76 Kilobasi, mentre la regione codificante è formata da 1461 paia di basi e consta di 4 esoni (D'Esposito, Quaderi et al. 1996). Il messaggero possiede una regione 3' UTR particolarmente lunga, localizzata nel quarto esone, di 8.5 kilobasi. Sono stati isolati e identificati 3 trascritti, rispettivamente di 1.8 kilobasi, 7.5 kilobasi circa e 10 kilobasi circa, derivanti da un differente funzionamento del segnale di poliadenilazione nella regione 3'UTR. I trascritti più rappresentati nei tessuti umani sono il più corto e il più lungo. Esistono due forme di splicing alternativo: MeCP2A è formata da 486 residui, manca dell'esone 1, la traduzione parte da un codone di inizio alternativo situato nel secondo esone, e continua con gli esoni 3 e 4; MeCP2B è invece composta dagli esoni 1, 3 e 4, è lunga 498 amminoacidi ed ha un peso molecolare di 52kDa. Le due isoforme differiscono quindi nella loro porzione ammino terminale (Mnatzakanian, Lohi et al. 2004). L'isoforma B è quella più rappresentata, ed è quella a cui ci si riferisce quando si parla in modo generico di MeCP2. È espressa in tutti i tessuti, incluso il cervello, sia adulto che fetale, dove è espressa a livelli dieci volte più elevati rispetto all'isoforma A.

2.1. Struttura della proteina

Mecp2 è formata da 2 domini funzionali: il dominio di legame alle isole CpG metilate (MBD), localizzato nella regione ammino terminale, e il dominio di repressione della trascrizione (TRD). Infine, possiede un segnale di localizzazione nucleare (NLS) che le consente di entrare nel nucleo per svolgere la sua funzione. Non sono note le funzioni della regione carbossi terminale. Il dominio di legame alle isole CpG metilate è stato isolato ed identificato per la prima volta da Nan e colleghi nel 1993, e si estende dal residuo 78 fino al 163 (Nan, Meehan et al. 1993). È un dominio di legame al DNA, con un'affinità 2-3 volte maggiore per sequenze metilate rispetto a quelle non metilate. In particolare il dominio MBD riconosce e lega una coppia di dinucleotidi CpG metilati (contrariamente a quanto fa MeCP1, che ha una specificità superiore per sequenze ricche in numerose coppie di dinucleotidi CpG metilati) (Boyes and Bird 1992).



Figura 1. Rappresentazione tridimensionale della struttura terziaria della proteina MeCP2.

La risonanza magnetica nucleare ha fatto luce sulla struttura tridimensionale di questo dominio: appare come uno spicchio formato da un foglietto β antiparallelo a 3 filamenti da una parte, e un'alfa elica nella parte più carbossi terminale. I foglietti β 1 e 2 sono connessi tra loro da un

loop non organizzato di 5 residui, di cui uno positivo e due polari. I primi 26 amminoacidi del lato ammino terminale e gli ultimi 19 di quello carbossi terminale non hanno una struttura secondaria organizzata e circondano la regione centrale strutturata, che va dal residuo 103 al residuo 145 (Wakefield, Smith et al. 1999).

Il dominio di repressione della trascrizione è stato identificato nel 1997 ed è formato dai residui 205-310 (Nan, Campoy et al. 1997). Agisce interagendo con il corepressore Sin3A, che a sua volta recluta le istone deacetilasi HDAC1 e HDAC2 (Jones, Veenstra et al. 1998).

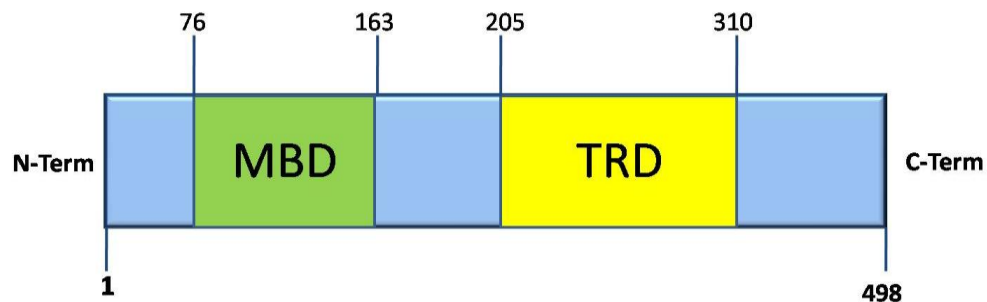


Figura 2. Rappresentazione schematica dei domini della proteina MeCP2. I residui 76-163 formano il dominio di legame alle isole CpG metilate. I residui 205-310 contengono il dominio di repressione della trascrizione.

2.2. Domini di espressione

A livello di RNA messaggero, l'espressione del trascritto è ubiquitaria nell'embrione di topo, nell'adulto è espresso ad alti livelli in tutti i neuroni, in modo particolare quelli dei bulbi olfattivi e dell'ippocampo (Coy, Sedlacek et al. 1999).

L'espressione della proteina è invece selettiva per alcuni tessuti e finemente regolata: nel topo a stadio E 10.5 MeCP2 è espressa solamente a livello di poche cellule nella zona marginale del cervello in sviluppo. A

stadio E 11.5, l'espressione è aumentata nelle cellule della zona marginale come intensità e numero di cellule positive, e si è estesa anche alla spina dorsale, al ponte e alla medulla. A stadio E 14.5 la proteina è presente anche a livello del talamo, dei nuclei caudato e putamen e nel cervelletto. Tra gli stadi E14.5 e E 16.5 si osserva che l'espressione di MeCP2 si concentra negli strati più profondi e maturi della corteccia, ed è invece assente negli strati più superficiali, al di sopra delle cellule di Cajal-Retzius, sede primaria di espressione di MeCP2. A partire dallo stadio E 16.5 fino a E 18.5 e P0 l'espressione di MeCP2 compare anche negli strati superficiali, ma rimane sempre ad un livello inferiore rispetto agli strati profondi. L'espressione non è rilevabile nelle cellule gliali a nessuno stadio. Questo pattern di espressione suggerisce che MeCP2 abbia una funzione fondamentale nello sviluppo del sistema nervoso centrale, poiché viene espressa dapprima nelle strutture ontogeneticamente più antiche, come la spina dorsale, e successivamente nelle strutture più "moderne" come l'ippocampo e la corteccia (Shahbazian, Antalffy et al. 2002).

Nel topo adulto la proteina è espressa in quasi tutti i tessuti, in modo preponderante nel cervello, ma anche nei polmoni, nella milza, in minor misura nel cuore, nel rene ed è debolmente rilevabile per Western Blot anche nel fegato, nella mucosa gastrica e nell'intestino tenue (Shahbazian, Antalffy et al. 2002).

Anche a livello subcellulare, la distribuzione di MeCP2 varia durante lo sviluppo: a stadio E 10.5 appare distribuita in modo diffuso in tutta la superficie nucleare; dallo stadio E 16.5 diviene invece maggiormente punteggiata, in particolare a livello dell'eterocromatina pericentrica del

DNA (Nan, Tate et al. 1996). In particolare, Marchi e colleghi hanno evidenziato che MeCP2 localizza in modo specifico a livello dei cromocentri, zone di eterocromatina altamente compattata, compatibilmente con il suo ruolo di repressore dell'espressione genica (Marchi, Guarda et al. 2007).

2.3. Possibili ruoli funzionali

Secondo il modello maggiormente accreditato, MeCP2 agisce inibendo l'espressione genica attraverso due meccanismi differenti; uno di questi è dipendente dall'azione di istone deacetilasi, grazie al quale MeCP2 è in grado di mediare modifiche posttraduzionali alle code istoniche interagendo con Sin3A, un corepressore fornito di un dominio PAH (Paired Amphipathic Helix), in grado di indurre repressione trascrizionale interagendo con il complesso Mad-Max. L'interazione tra MeCP2 e Sin3A porterebbe la cromatina ad una conformazione trascrizionalmente inattiva. Un altro meccanismo ipotizzato sembra essere indipendente dall'interazione di MeCP2 con Sin3A, perché un certo grado di repressione trascrizionale è stato osservato anche in assenza delle istone deacetilasi (Yu, Thiesen et al. 2000). MeCP2 agirebbe quindi riconoscendo sequenze di DNA altamente metilate, grazie al suo MBD, e, con il suo dominio TRD recluterebbe corepressori in grado di interagire con le istone deacetilasi (come Sin3A), o corepressori differenti, indipendenti dalle istone deacetilasi, come N-CoR e c-Ski, che agiscono attraverso pathway differenti (Kokura, Kaul et al. 2001). Infine, è stato osservato che MeCP2 è in grado di indurre repressione trascrizionale interagendo, mediante il suo

TRD, con il fattore di trascrizione TFIIB (Yu, Thiesen et al. 2000). MeCP2 ha anche un ruolo nello splicing: interagisce in vivo con la proteina Y-box binding protein 1 (Yb-1) in maniera RNA dipendente, e agisce da regolatore di splicing (Young, Hong et al. 2005).

Quando le mutazioni di MeCP2 sono state correlate con la patogenesi della Sindrome di Rett, numerosi studi hanno messo in evidenza che il ruolo di MeCP2 di inibitore della trascrizione potrebbe essere indipendentemente dall'interazione con corepressori e istone deacetilasi. Studi in vitro hanno dimostrato che MeCP2 è in grado di indurre autonomamente una compattazione della cromatina; questo renderebbe MeCP2 una proteina multifunzionale con un ruolo centrale nella definizione dell'architettura della cromatina (Georgel, Horowitz-Scherer et al. 2003). Più recentemente, studi di interazione tra MeCP2 e promotori hanno inaspettatamente evidenziato che la maggior parte dei promotori contattati da MeCP2 appartengono a geni trascrizionalmente attivi, mentre numerosi promotori con elevati livelli di metilazione non vengono legati da MeCP2. Questi dati contrastano con l'ipotesi che vede MeCP2 esclusivamente come un repressore trascrizionale; attualmente viene più generalmente considerato un regolatore trascrizionale multifunzionale (Yasui, Peddada et al. 2007).

2.4. Le mutazioni di MeCP2

Mutazioni di MeCP2 sono state identificate nel 95% dei pazienti affetti dalla forma classica e nel 20-40% di quelli affetti da forme atipiche. Ad oggi sono note più di 300 mutazioni a singolo nucleotide (riportate nel database all'indirizzo <http://mecp2.chw.edu.au/>), ma sono state descritte

anche grosse alterazioni, come delezioni che eliminano interi esoni (Archer, Whatley et al. 2006). Le prime 3 mutazioni identificate sul gene per MeCP2 sono le sostituzioni missenso R133C, la F155S e la T148M, isolate da Amir e colleghi nel 1999 i quali, durante uno screening di mutazioni nella regione Xq28 in pazienti affetti dalla forma classica della Sindrome di Rett, identificarono il gene responsabile della patologia (Amir, Van den Veyver et al. 1999). Nello stesso anno identificarono, in un paziente affetto da una forma sporadica di Rett, una mutazione frameshift che distrugge il dominio di repressione della trascrizione (R255T), ritrovata poi successivamente in numerosi pazienti con la forma classica (Cheadle, Gill et al. 2000), (Bienvenu, Carrie et al. 2000).

Ad oggi le mutazioni più comunemente ritrovate sono otto, tra cui missenso e nonsense, e rendono conto del 70% di tutte le mutazioni rinvenute in pazienti affetti dalla forma classica; un altro 10% è rappresentato da piccole delezioni della regione carbossi terminale, mentre grossi riarrangiamenti come inversioni e duplicazioni di parte del gene ricoprono il 6% del totale (Dragich, Houwink-Manville et al. 2000).

2.5. Mutazioni di MeCP2 e maschi affetti da Sindrome di Rett

Inizialmente si riteneva che la Sindrome di Rett colpisse solo individui di sesso femminile, ipotesi avvalorata dal modello di ereditarietà legata all'X dominante che prevede la letalità del sesso eterogametico. Il dogma fu infranto quando furono per la prima volta identificati dei maschi affetti da fenotipi variabili (assimilabili a forme varianti della Sindrome di Rett) portatori di mutazioni sul gene *MeCP2* (Jan, Dooley et al. 1999). Tali maschi vengono classificati in 4 categorie in base al fenotipo presentato:

- Al primo gruppo appartengono individui maschi portatori di un cromosoma X soprannumerario (47,XXY), che risultano quindi portatori di un allele normale e di uno mutante, e si trovano nella stessa condizione delle donne affette. Appartengono a questo gruppo anche individui affetti da forma classica, cariotipicamente normali (46,XY), portatori dell'allele mutante, in cui fenomeni di mosaicismo somatico ne permettono la sopravvivenza.
- Al secondo gruppo appartengono individui di sesso maschile con cariotipo 46,XY, portatori di mutazioni su MeCP2 che causano la forma classica nelle donne; questi individui sono affetti da una severa forma di encefalopatia congenita con morte precoce (OMIM 300673).
- Del terzo gruppo fanno parte quei maschi che portano mutazioni sul gene di MeCP2 che non sono mai state ritrovate nelle donne; questi individui mostrano fenotipi variabili come gravità e caratteristiche sintomatiche. Sono spesso presenti ritardo mentale, spasticità e problemi psichiatrici (OMIM 300055).
- Sono riportati casi di duplicazioni della regione genica contenente MeCP2. In questo caso gli individui possiedono due copie del gene, e una delle due è mutata. Anche in questo caso il fenotipo è variabile, ma sono sempre presenti una severa forma di ritardo mentale, disordini neurologici, spesso accompagnati da ricorrenti infezioni respiratorie (OMIM 300260).

2.6. Dal genotipo al fenotipo

Sin dalla scoperta della prima mutazione sul gene *MeCP2*, sono state formulate numerose ipotesi per correlare la perdita di funzione della

proteina con il fenotipo osservato nella Sindrome di Rett. La prima ipotesi avanzata sostiene che la mancata repressione trascrizionale mediata da MeCP2 induca uno stato più permissivo della cromatina, e l'espressione deregolata nel tempo e nello spazio di alcuni geni target di MeCP2 sarebbe alla base dei sintomi. La mancanza di MeCP2 sarebbe inoltre alla base di un deregolazione nella struttura fisica della cromatina, che verrebbe a trovarsi in uno stato meno compattato, causando problemi alle cellule in divisione o a quelle post-mitotiche che devono riassemblare la cromatina (Willard and Hendrich 1999). È stato inoltre proposto che, a livello del SNC, i neuroni con difetti del silenziamento epigenetico non siano in grado di produrre le normali risposte molecolari, con la giusta tempistica, a causa dell'aumento dell'attività trascrizionale aspecifica, che causerebbe una sorta di "noise", un rumore di fondo che intralocerebbe le vie di trascrizione specifiche della cellula neuronale (Bird 1995). L'azione di MeCP2 è dipendente dalla fosforilazione di alcuni suoi residui. Nel sistema nervoso centrale la fosforilazione di MeCP2 è influenzata da stimoli extracellulari e contribuisce alla regolazione dinamica dell'azione della proteina. È noto che MeCP2 si lega al promotore del Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) e ne reprime la trascrizione. Chen e colleghi hanno dimostrato che questa funzione di MeCP2 è dipendente dal suo stato di fosforilazione: l'aggiunta di un gruppo fosfato sul residuo di serina in posizione 421 causa un cambiamento dell'affinità di MeCP2 per il promotore di BDNF, inducendo il suo distacco e eliminando quindi il blocco trascrizionale (Chen, Chang et al. 2003). Inoltre, la fosforilazione in posizione 421 influenza la capacità di MeCP2 di regolare la crescita dendritica e la maturazione delle spine (Zhou, Hong et al. 2006). Le alterazioni patologiche osservate nella Sindrome di Rett potrebbero essere

quindi causate da un'alterazione del pathway del BDNF. Infine, sembra che l'attività neuronale inneschi la defosforilazione del residuo di serina in posizione 80, diminuendo l'affinità di MeCP2 per alcuni dei suoi promotori target (Tao, Hu et al. 2009). Nel 2001 Chen e colleghi hanno realizzato un modello animale che ricalca per numerosi aspetti la patologia nell'uomo. I topi maschi, knock-out per il gene codificante MeCP2, contrariamente a quanto atteso, sono vitali. Hanno uno sviluppo post natale perfettamente normale durante le prime cinque settimane; da questo momento in poi si iniziano ad osservare le prime manifestazioni patologiche: i topi sono nervosi, mostrano tremiti che percorrono tutto il corpo, vanno incontro a rizzamento del pelo e talvolta hanno difficoltà respiratorie. Un significativa percentuale di tali topi diventa sovrappeso. Negli stadi più avanzati divengono ipoattivi, tremano quando maneggiati, e molti vanno incontro ad una cospicua perdita di peso. Inoltre si osservano alterazioni nell'arborizzazione dendritica (Kishi and Macklis 2004), nella trasmissione sinaptica basale, nella plasticità sinaptica (Asaka, Jugloff et al. 2006). I mutanti mostrano anche una ridotta attività corticale spontanea dovuta allo sbilanciamento tra il circuito eccitatorio e quello inibitorio (Dani, Chang et al. 2005). Muoiono generalmente alla decima settimana di vita. Le femmine eterozigoti appaiono normali per i primi quattro mesi; successivamente manifestano aumento di peso, ridotta attività generale e andatura rallentata. Il cervello di questi topi, prelevato post mortem, mostra una riduzione di volume e i neuroni appaiono più piccoli, ma non si osservano difetti strutturali o segni di neurodegenerazione. La delezione di MeCP2 nel solo cervello a stadio E 12.0 rivela un fenotipo identico a quello del mutante completo, rivelando che il fenotipo è causato dalla mancanza di MeCP2 nel sistema nervoso

centrale e non nei tessuti periferici. Il fenotipo che si ottiene è lo stesso quando l'eliminazione di MeCP2 è indotta esclusivamente nel sistema nervoso postnatale. Questo dimostra che MeCP2 è importante per lo sviluppo del cervello, ma la sua presenza è fondamentale per i neuroni post mitotici (Chen, Akbarian et al. 2001). L'espressione di MeCP2 esclusivamente nei neuroni post mitotici dei topi knock-out recupera il fenotipo Rett-like, dimostrando ancora una volta l'importanza di questa proteina nella maturazione neuronale (Luikenhuis, Giacometti et al. 2004).

3. FOXG1

Il gene *FOXG1* (*Forkhead Box G1*), chiamato anche HFKL1 o BF1, codifica per un fattore di trascrizione con attività di repressore (Murphy, Wiese et al. 1994). Appartiene ad una famiglia di fattori di trascrizione di cui fa parte anche il gene omoetico di *Drosophila Forkhead* e il gene *HNF3* (fattore nucleare 3 gli epatociti, gene master nello sviluppo del fegato). I membri di questa famiglia condividono lo stesso dominio di legame al DNA, il Forkhead domain (FKH domain). Il forkhead domain si organizza in due alfa-eliche, una regione centrale che funge da cardine e infine un subdominio ricco in amminoacidi basici.

Il cDNA di FOXG1 è stato identificato nel 1994 da Murphy e colleghi, attraverso analisi di cross-ibridazione tra librerie di cDNA umane e il Forkhead domain di HNF3A, di ratto. In questo modo sono stati isolati 10 cDNA, dalle librerie di cervello fetale e di testicolo. Una di queste, chiamata HFK1 (human forkhead-1), e successivamente FOXG1, codifica per una proteina di 489 amminoacidi. Il gene mappa al locus 14q12 (Murphy, Wiese et al. 1994). Nel 2007 Bredenkamp e colleghi dimostrarono che la sequenza codificante di FOXG1 è formata da un unico esone (Bredenkamp, Seoighe et al. 2007).

FOXG1 consta di vari domini. I residui dal 182 al 258 costituiscono il Forkhead Domain, un dominio di legame al DNA altamente conservato. FOXG1 possiede inoltre un dominio di interazione con i corepressori della famiglia Groucho/TLE1, situato nella regione carbossi-terminale di FOXG1, precisamente nei residui 276-336 (Yao, Lai et al. 2001; Roth, Bonev

et al. 2010). È stato osservato che FOXG1 interagisce con alcune istone deacetilasi, ma il dominio di interazione non è stato ancora identificato (Yao, Lai et al. 2001).

3.1. Ipotesi sul ruolo funzionale di FOXG1

La funzione di FoxG1 non è stata ad oggi del tutto chiarita. È noto che riveste un ruolo fondamentale nello sviluppo del cervello. Il suo dominio di espressione è circoscritto al cervello, sia in via di sviluppo che in quello adulto, e in minima parte è espresso anche nel testicolo. Durante lo sviluppo, l'espressione di FOXG1 è ristretta al neuroepitelio che darà origine al telencefalo, e in questo modo marca la regione che diventerà telencefalo. La sua espressione è rilevabile anche nella emiretina nasale e nel peduncolo ottico. Nelle fasi successive dello sviluppo, grazie all'azione combinata di FOXG1, Sonic Hedgehog e del Fibroblast Growth Factor (FGF), il primordio del telencefalo passa da essere monostratificato a tessuto multicellulare.

La regolazione dell'espressione di FOXG1 sembra avere un ruolo fondamentale per il corretto sviluppo di numerose popolazioni di neuroni. In particolare, è stato osservato che FOXG1 è fondamentale per il corretto sviluppo dei neuroni di Cajal-Retzius, il tipo di neuroni corticali che compare per primo durante lo sviluppo. Hanashima ha evidenziato come i neuroni di Cajal-Retzius vengano soppressi dalla presenza di FOXG1; topi knockout per FOXG1 sviluppano invece un eccesso di questo tipo di neuroni. Tuttavia l'effetto più severo della mancanza di FOXG1 è una drastica riduzione della massa corticale, per cui topi knock-out per FOXG1

evidenziano una quasi totale assenza degli emisferi (Hanashima, Li et al. 2004). È stato infatti proposto che FOXG1 agisca promuovendo la proliferazione dei neuroni e impedendone il differenziamento a livello del telencefalo. La capacità di FOXG1 di sostenere la proliferazione dei precursori neuronali dipende dalla sua localizzazione subcellulare, che a sua volta è regolata dalla casein-chinasi-I (CKI) e dalla chinasi Akt. La fosforilazione di FOXG1 da parte di CKI sul residuo di serina 19 di FOXG1 promuove l'importazione nel nucleo, dove FOXG1 agisce inibendo il differenziamento dei progenitori neuronali; per contro, la fosforilazione da parte di Akt, stimolata dall'FGF, sul residuo di treonina 226, promuove l'esportazione di FOXG1 nel citoplasma, e consente il differenziamento dei neuroblasti (Regad, Roth et al. 2007). Sulla base di tali osservazioni, Dastidar e colleghi sostengono che FOXG1 promuove la sopravvivenza dei neuroni corticali inserendosi nel pathway della PI-3 chinasi e di Akt, agendo da effettore a valle della via di trasduzione mediata *dall'insulin-growth factor (IGF)* (Dastidar, Landrieu et al. 2011). Nel cervello adulto FOXG1 agisce inibendo l'apoptosi.

Ariani e colleghi hanno dimostrato che FOXG1 colocalizza con MeCP2 sia in vivo, nel proencefalo durante lo sviluppo, che in vitro, in neuroni primari in coltura e in fibroblasti murini (NIH 3T3); tale relazione è ancora in gran parte da chiarire, ma sembra suggerire che le due proteine potrebbero lavorare di concerto in un pathway comune durante lo sviluppo del cervello (Ariani, Hayek et al. 2008).

3.2. Mutazioni di FOXG1 e variante congenita della Sindrome di Rett

Mutazioni a carico del gene *FOXG1* sono causa di una forma atipica della Sindrome di Rett, definita Forma Congenita (OMIM 613454), caratterizzata da un esordio più precoce rispetto alla forma classica, per cui i bambini affetti iniziano a mostrare i primi segni (arresto dello sviluppo fisico e cognitivo, microcefalia) già nel primo mese di vita. La correlazione tra FOXG1 e la Sindrome di Rett è stata identificata nel 2008, quando Ariani e colleghi identificarono le prime due mutazioni sul gene *FOXG1*: la mutazione W255X, causata dalla sostituzione 765 G-A, che porta alla formazione di una proteina troncata a livello del Forkhead domain e la mutazione 969delC, che porta anch'essa alla produzione di una proteina più corta, mancante del dominio di interazione con JARID1B (Ariani, Hayek et al. 2008). Da allora sono state identificate numerose altre mutazioni sul gene FOXG1, sia di tipo missenso che frameshift, correlate allo sviluppo della Sindrome di Rett.

4. CDKL5

Il gene *CDKL5* (Cyclin-Dependent Kinase-like 5), chiamato anche *STK9* (Serine-Threonine kinase 9), è stato identificato durante uno studio di mappaggio trascrizionale nella regione 22 del braccio corto del cromosoma X; Montini e colleghi individuarono un esone codificante un prodotto con elevata omologia di sequenza con proteine appartenenti alla famiglia delle serina-treonina chinasi (Montini, Andolfi et al. 1998). Il gene *CDKL5*, situato al locus Xp22.13, è composto di 24 esoni, 21 dei quali tradotti in proteina, contrariamente ai primi 3, (esoni 1, 1a 1b) che non vengono tradotti, ma portano alla formazione di due varianti di splicing, differenti per la regione 5'-UTR (Kalscheuer, Tao et al. 2003). Recentemente sono state identificate altre due forme di splicing alternativo: Fichou e colleghi hanno identificato un nuovo esone, chiamato 16b poiché situato tra l'esone 16 e il 17 (Fichou, Nectoux et al. 2011); Williamson e colleghi hanno invece isolato un nuovo trascritto, più breve dei precedenti, che termina con l'introne 18, il quale viene tradotto e fornisce un codone di stop alternativo (Williamson, Giudici et al. 2011).

Attualmente sono state dunque identificate 4 forme di splicing alternativo:

- L'isoforma I è composta degli esoni 1-21, esclude gli esoni 1a e 1b. È presente in una grande varietà di tessuti, compresi i fibroblasti e alcune linee cellulari linfoblastoidi. Il codone di inizio è situato nell'esone 2, il codone di stop nell'esone 21. La proteina è costituita di 1030 residui, ed ha un peso molecolare di 115 kDa.
- L' isoforma II contiene, in più rispetto all'isoforma I, gli esoni 1a e 1b. Il trascritto è espresso a bassi livelli solamente a livello del cervello fetale e del testicolo. La proteina è identica a quella codificata dall'isoforma I.

- L'isoforma III, descritta nel 2011, contiene l'esone alternativo 16b. Codifica per una proteina più lunga, formata di 1071 amminoacidi, con un peso molecolare di 120 kDa, espressa quasi esclusivamente nella corteccia, nel cervelletto, nell'ippocampo e nei bulbi olfattivi (Fichou, Nectoux et al. 2011).
- L'isoforma IV, anch'essa isolata nel 2011, è una forma di splicing alternativo che termina con l'introne 18. Il trascritto è quello maggiormente rappresentato nel cervello; codifica per una proteina di 960 amminoacidi, del peso molecolare di 107 kDa, e possiede un'estremità carbossi-terminale più corta rispetto alla forma da 1030 amminoacidi (Williamson, Giudici *et al.* 2011). Né l'isoforma III né l'isoforma IV contengono gli esoni 1a e 1b.



Figura 3. Rappresentazione schematica del gene hCDKL5 e dei suoi esoni. In blu gli esoni presenti in tutte le forme di splicing della proteina. In rosso gli esoni 1a e 1b presenti solo nell'isoforma II. In giallo l'esone alternativo 16b, presente nella sequenza codificante l'isoforma III; tratteggiato l'introne 18 che costituisce l'ultimo esone nell'isoforma alternativa IV.

Le isoforme I e II sono espresse, nel topo, a livello del muscolo scheletrico, del cervelletto, della corteccia, dell'ippocampo, dei bulbi olfattivi e, in minor misura, nel rene, nel polmone e nel cuore; sono assenti invece nel fegato. Le isoforme III e IV sono espresse soprattutto nel SNC; si ritrovano infatti quasi esclusivamente nel cervelletto, nella corteccia, nell'ippocampo e nei bulbi olfattivi, con bassissimi livelli di espressione anche nel fegato; sono assenti negli altri tessuti (Fichou, Nectoux et al. 2011- Williamson, Giudici *et al.* 2011).

Lin e colleghi hanno esaminato la localizzazione di CDKL5 nell'embrione intero di topo a stadi precoci. A partire dallo stadio E 7.5 fino alla nascita si osserva una distribuzione diffusa in tutti i tessuti dell'embrione, senza zone di particolare intensità (Lin, Franco et al. 2005).

4.1. Struttura della proteina

CDKL5 (Cyclin -Dependent Kinase-like 5), nella sua forma lunga 1030 residui, è formata da vari domini. Possiede un dominio catalitico ad azione serina-treonina chinasi nella regione ammino terminale, formato dai residui 11-297. Tale dominio catalizza il trasferimento di un gruppo fosfato in posizione gamma dell'ATP a residui di serina o treonina presenti sulle proteine substrato. Il dominio carbossi-terminale si estende per un terzo di tutta la proteina, e sembra essere importante per numerose funzioni della proteina. È presente un dominio di interazione con MeCP2, localizzato nella regione formata dai residui 450-550.

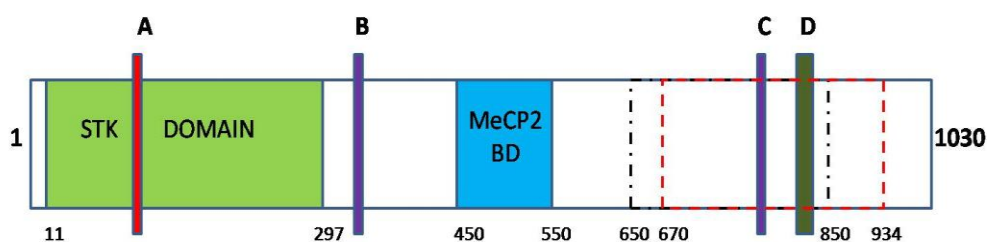


Figura 4. Rappresentazione schematica della proteina hCDKL5 e dei suoi domini. I residui 11-297 costituiscono il dominio chinasi; i residui 450-550 il dominio di interazione con MeCP2. I residui 650-850 costituiscono la regione in cui cade il dominio di legame alla DNMT1; tra i residui 670-934 è presente il dominio di interazione con Rac1 (le due regioni risultano parzialmente sovrapposte per la carenza di dati che possano dare una definizione migliore dei due domini). Inoltre, in A (residui 152-165) è presente l'activation loop, in cui i residui 169, 170 e 171 costituiscono il motivo TEY. B e C (residui 312-315 e 784-789) sono segnali di localizzazione nucleare, NLS. In D, residui 836-845, è presente un segnale di esportazione nucleare, NES.

Gli amminoacidi 650-850 sono invece responsabili dell'interazione tra CDKL5 e la de novo metil transferasi 1 (DNMT1). CDKL5 possiede inoltre numerosi siti di legame per l'ATP e un A-loop (loop di attivazione) nei residui 152-176, comune a tutte le tirosin chinasi, che media la transfosforilazione delle tirosine e, nei recettori dimerici, causa la dimerizzazione dei recettori e la creazione di siti di legame fosfotirosinici per effettori a valle. All'interno dell'activation loop è presente il dominio TEY (residui di treonina 169, acido glutammico 170 e tirosina 171), a livello del cui residuo di tirosina avviene l'autofosforilazione di CDKL5 mediata dal suo dominio catalitico. Sono presenti due sequenze ricche in amminoacidi basici che fungono da segnali di localizzazione nucleare (NLS), il primo nei residui 312-315, il secondo nei residui 784-789. CDKL5 possiede anche una regione, nel dominio carbossi-terminale, che ne regola l'esportazione fuori dal nucleo, un putativo segnale NES, formato dai residui 836-845 (per una rappresentazione grafica si veda figura 4).

4.2. Localizzazione e funzione

La funzione di CDKL5 non è stata ancora chiarita. Analisi di sequenza suggeriscono che CDKL5 appartenga alla sottofamiglia delle chinasi che fosforilano residui di serina e treonina. CDKL5 ha inoltre elevata omologia di sequenza sia con i geni per le MAP chinasi, sia con quelli che codificano per le chinasi-ciclina dipendenti (CDK), da cui appunto il nome della proteina (cyclin-dependent kinase-like 5).

A livello cellulare, è stato dimostrato che CDKL5 è una proteina pressoché ubiquitaria, espressa in numerose linee cellulari, sia umane che di ratto. La

sua espressione è stata accertata in linee cellulari umane di tumore prostatico androgeni-dipendente (PC3), androgeni-indipendente (LnCAP), cellule di rene embrionale umane (HEK-293), linee cellulari di polmone umane (HBE), di epitelio tracheale (HTE) e linee neuronali di ratto ippocampali (H19-7), gliali (H19-5), del Raphe (RN33B). Questi dati confermano la teoria che CDKL5 sia una proteina ubiquitaria (Lin, Franco et al. 2005).

Sebbene le prime evidenze facessero ritenere che CDKL5 fosse una proteina esclusivamente nucleare, Bertani e colleghi hanno dimostrato che CDKL5 è presente sia nel nucleo sia nel citoplasma, e che la sua localizzazione sarebbe dipendente dallo stadio di sviluppo e dal tipo cellulare; secondo gli autori CDKL5 sarebbe capace di spostarsi in modo dinamico tra i due compartimenti (Bertani, Rusconi et al. 2006). Nei neuroni la frazione nucleare è circa il 20% durante gli stadi prenatali, cresce durante i primi stadi postnatali, parallelamente alla maturazione dei neuroni, e rimane stabile al 40% fino agli stadi adulti (Rusconi, Salvatoni et al. 2008). La localizzazione subcellulare varia anche in funzione del sottotipo cellulare: Rusconi e colleghi hanno dimostrato che nei neuroni di ippocampo, corteccia, ipotalamo e talamo circa il 40% della proteina è confinata nel nucleo; viceversa, nello striato e nel cervelletto la frazione citoplasmatica arriva fino all'80%, con una particolare distribuzione punteggiata distribuita in tutto il citoplasma. Appare quindi chiaro che la localizzazione dinamica di CDKL5 risponda ad uno stato funzionale della cellula (Rusconi, Salvatoni et al. 2008).

Secondo Rusconi e colleghi la localizzazione subcellulare sarebbe dipendente dal dominio carbossi terminale della proteina (Rusconi,

Salvatoni et al. 2008). Gli autori dimostrano che la localizzazione subcellulare della proteina di fusione GFP-hCDKL5 corrisponde a quella della proteina endogena, e si distribuisce sia nel nucleo che nel citoplasma, in cellule HeLa trasfettate in coltura; viceversa, la proteina mancante degli ultimi 200 amminoacidi all'estremità carbossi terminale (GFP-hCDKL5 Δ C831) si localizza quasi esclusivamente nel nucleo; la proteina mancante degli ultimi 88 amminoacidi (GFP-hCDKL5 Δ C941) invece non mostra una localizzazione diversa dalla proteina intera, indicando che la regione che regola la localizzazione subcellulare di CDKL5 è inserita tra gli amminoacidi 831 e 941, e che questa regione è necessaria per consentire l'esportazione di CDKL5 fuori dal nucleo. Secondo l'ipotesi degli autori, il meccanismo di trasporto di CDKL5 dal nucleo al citoplasma sarebbe da attribuire al sistema CRM1-esportina 1. Tale sistema dipende dalla presenza nelle proteine substrato di un segnale di esportazione nucleare (NES); l'analisi bioinformatica della sequenza primaria di CDKL5 ha portato ad identificare un putativo NES, tra i residui 836-845, ricco in amminoacidi basici (LKSLRKLLHL). Tale sequenza ha elevata omologia con la sequenza consensus comune a tutti i segnali NES (LX(2,3)[LIVFM]X(2,3)LX[LI]; 38). Esperimenti accessori non hanno però confermato l'ipotesi che tale segnale sia necessario e sufficiente a garantire l'esportazione di CDKL5 dal nucleo (Rusconi, Salvatoni et al. 2008).

La rimozione del dominio carbossi-terminale ha conseguenze drastiche anche sulla funzionalità della proteina. La mancanza di tale dominio determina un aumento dei livelli di espressione di CDKL5 e una deregolazione dell'attività di autofosforilazione (Lin, Franco et al. 2005). Secondo Bertani e colleghi il dominio carbossi terminale agirebbe come

regolatore negativo dell'attività chinastica, di cui è direttamente responsabile il dominio STK, situato all'estremità ammino terminale (Bertani, Rusconi et al. 2006).

4.3. CDKL5 e MeCP2

La prima ipotesi sul ruolo funzionale di CDKL5 si basa sull'osservazione di Mari e colleghi che l'espressione di CDKL5 nel cervello di topo adulto ricalca quella di MeCP2 (Mari, Azimonti et al. 2005). L'attività di MeCP2 è dipendente dalla fosforilazione di alcuni dei suoi residui di serina, pertanto gli autori hanno ipotizzato che CDKL5 potrebbe essere direttamente responsabile della fosforilazione di MeCP2, grazie all'attività del suo dominio serina-treonina chinastico. L'interazione tra MeCP2 e CDKL5 avviene a livello proteico, essendo stato dimostrato da Mari e colleghi che le due proteine non interagiscono a livello trascrizionale. Come MeCP2, l'espressione di CDKL5 è debolmente rilevabile negli stadi embrionali, e aumenta drasticamente nei primissimi stadi postnatali, in particolar modo a livello dei neuroni che hanno raggiunto la loro posizione definitiva nel cervello in sviluppo. Esistono però numerose differenze: sebbene la maggior parte dei neuroni corticali esprime, a P10, elevati livelli di entrambe le proteine, a livello del cervelletto, nelle cellule del Purkinje si osserva una massiccia espressione di MeCP2 ma una molto più debole espressione di CDKL5, mentre nelle cellule granulari il rapporto è invertito. Questo dimostra che l'espressione dei due geni è regolata in modo diverso nei vari tessuti, e che le vie di regolazione dell'espressione sono indipendenti. Tramite esperimenti di GST-pull down gli autori dimostrano che le due proteine interagiscono in vitro, e

che il dominio carbossi terminale di MeCP2 (contenente il dominio di repressione della trascrizione) sembra essere direttamente coinvolto nel legame. La regione di CDKL5 importante per l'interazione è contenuta tra i residui 450-550, escludendo quindi che il dominio catalitico situato all'estremità N-terminale contribuisca al legame con MeCP2; in particolare il dominio catalitico sembra agire negativamente sul legame con MeCP2. Gli autori dimostrano, attraverso esperimenti di immunoprecipitazione, western blotting e coimmunoprecipitazione, in cellule 293T, che CDKL5 e MeCP2 interagiscono anche in modelli cellulari, e che tale interazione si verifica a livello del nucleo (Mari, Azimonti et al. 2005). Gli autori sostengono quindi che CDKL5 fosforili direttamente MeCP2. Tale affermazione è stata successivamente smentita da Lin e colleghi, i quali sostengono che la fosforilazione diretta di MeCP2 mediata da CDKL5 rilevata da Mari e colleghi fosse in realtà causata da un'attività chinasi spuria presente nell'immunoprecipitato, e propongono un modello differente secondo cui MeCP2 recluterebbe CDKL5 a livello di un complesso di legame al DNA, in cui sarebbe presente il vero target di CDKL5 (Lin, Franco et al. 2005). L'ipotesi che le due proteine possano agire in un pathway comune è rafforzata dall'osservazione che CDKL5 e MeCP2 legano, in due siti diversi, il dominio ammino terminale della de novo metil transferasi 1 (DNMT1) (Kameshita, Sekiguchi et al. 2008). Sebbene l'espressione delle due proteine sembri regolata secondo pathway indipendenti, secondo le osservazioni di Carouge e colleghi MeCP2 agirebbe da regolatore dell'espressione di CDKL5: gli autori dimostrano che la sovraespressione di MeCP2 in vitro causa una diminuzione dei livelli di espressione di CDKL5, e che in vivo MeCP2 interagisce direttamente con il promotore di CDKL5, impedendone la trascrizione

(Carouge, Host et al. 2010). Nonostante sia stata accertata l'interazione tra CDKL5 e MeCP2 a più livelli, rimane ancora molto da chiarire circa il pathway in cui sarebbero coinvolte le due proteine e come le mutazioni osservate potrebbero influire su questo pathway e indurre le alterazioni patologiche osservate nella Sindrome di Rett.

4.4. CDKL5 e la morfogenesi dendritica

CDKL5 è espressa sia nel nucleo che nel citoplasma, e cambia la sua localizzazione in funzione dello stadio di sviluppo e del grado di maturazione neuronale. Negli ultimi anni è stato ipotizzato che CDKL5 potrebbe essere coinvolta nella maturazione dei neuroni e nella morfogenesi dei dendriti. Sul filo di questa ipotesi, Chen e colleghi hanno effettuato degli esperimenti di perdita di funzione in neuroni corticali in coltura attraverso l'uso di uno *short hairpin RNA*, che impedisce la traduzione del messaggero. In base ai loro esperimenti, si osserva che la mancanza di CDKL5 esita in una marcata riduzione del numero e della arborizzazione dei dendriti e in una riduzione in lunghezza degli assoni. Parallelamente, dimostrano che la sovraespressione di CDKL5 causa un aumento nel numero dei dendriti, mentre l'overespressione del mutante K42R (privo di attività chinastica), così come l'overespressione del mutante patologico $\Delta C790$, non ha alcun effetto sulla morfogenesi dendritica. Viceversa si osserva un incremento nell'arborizzazione dendritica, sebbene più moderato rispetto alla situazione wild type, se si overesprimono i mutanti patologici C152F e R175S. Tali dati sono confermati anche in vivo attraverso l'elettroporazione in utero di embrioni di ratto con i sopracitati costrutti.

Gli autori hanno dimostrato che CDKL5 è presente nella frazione citoplasmatica di estratti cellulari di neuroni di ratto in coltura; esperimenti di immunocitochimica mostrano inoltre che CDKL5 colocalizza con la F-actina nei coni di crescita degli assoni, indicando che questa proteina potrebbe avere un ruolo nella regolazione dell'actina citoscheletrica. In base a tutte queste osservazioni, è lecito ipotizzare che CDKL5 potrebbe inserirsi nel pathway delle Rho-GTPasi, coinvolto nella regolazione della polimerizzazione dell'actina citoscheletrica e nella morfogenesi neuronale. Esperimenti di colocalizzazione e di GST pull-down mostrano che CDKL5 interagisce, direttamente o indirettamente, con Rac1, un membro della superfamiglia delle Rho-GTPasi. Il dominio di CDKL5 responsabile di tale interazione sembra essere la regione contenuta nei residui 670-934. L'attività di Rac1 è indotta da fattori di crescita (Hall 1998); in questo contesto, sembra che l'interazione tra CDKL5 e Rac1 sia rafforzata dalla presenza di fattori di crescita neurotrofici, in particolare del Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Chen, Zhu et al. 2010). Basandosi su queste osservazioni, è possibile ipotizzare che CDKL5 possa avere un ruolo nella morfogenesi dendritica e nella crescita assonica, e che tale ruolo sia svolto dalla frazione citoplasmatica. Ulteriori studi potranno meglio chiarire questo aspetto.

4.5. CDKL5 e la maturazione dei pre-mRNA

Recentemente è stato dimostrato che la frazione nucleare di CDKL5 si organizza in una distribuzione peculiare punteggiata (Rusconi, Salvatoni et al. 2008). La natura di questa distribuzione e il suo possibile ruolo funzionale sono stati almeno in parte chiariti da Ricciardi e colleghi.

Secondo gli autori CDKL5 localizza e si associa con una serie di fattori di splicing e snRNPs (complessi ribonucleoproteici), che si organizzano a livello nucleare in strutture chiamate *nuclear speckles*, che assumono la sopracitata morfologia punteggiata (Ricciardi, Kilstrup-Nielsen et al. 2009). Tali strutture sono domini discreti all'interno del nucleo in cui particelle ribonucleoproteiche (snRNPs), spliceosomi e fattori di splicing non ribonucleoproteici si accumulano (Lamond and Spector 2003). Le speckles sono strutture dinamiche, che cambiano rapidamente morfologia in funzione dello stato fisiologico della cellula, e fungono da siti di stoccaggio per le proteine e i complessi ribonucleoproteici coinvolti nel meccanismo dello splicing. Gli autori dimostrano che CDKL5 è presente in queste strutture (sia tramite immunofluorescenza che tramite esperimenti di immunoprecipitazione), e che si associa in modo specifico ad alcune proteine presenti nelle speckles, ma non alla componente a RNA. In particolare, dimostrano che CDKL5 interagisce con la snRNP SC35 e con la serine-rich protein Sm.

La mobilitazione dei fattori di splicing verso le zone di maturazione degli RNA avviene grazie a meccanismi di fosforilazione/defosforilazione. Secondo gli stessi autori l'overespressione di CDKL5 causa il disassemblamento delle speckles e favorisce la mobilitazione dei fattori di splicing; questo è vero per la proteina wild-type, che conserva la funzionalità del dominio chinasi, poiché l'overespressione della forma mutante in posizione 42 di CDKL5 (una forma completamente priva dell'attività chinasi), CDKL5 K42R, non causa nessuna alterazione nella morfologia delle speckles, indicando che la fosforilazione da parte di CDKL5 è importante per l'equilibrio dinamico dei componenti di queste

strutture. In modo analogo, il mutante privo di tutto il dominio ammino terminale (CDKL5 Δ N) non modifica la morfologia delle speckles, mentre un effetto sulle speckles si osserva in presenza dell'overespressione del mutante all'estremità carbossi-terminale, che possiede un dominio chinasi normale (CDKL5 Δ C525), confermando ancora una volta che questo effetto specifico di CDKL5 è dipendente dal suo dominio chinasi. Infine, il mutante CDKL5 R175S, che ha una ridotta attività chinasi, quando overespresso induce disassemblamento delle speckles, anche se in misura minore. Viceversa, la down regulation della forma wild type di CDKL5 attraverso l'uso di una shRNA induce un aumento delle dimensioni delle speckles ed un aumento della concentrazione di alcuni componenti di esse. Infine, gli autori dimostrano che l'overespressione di CDKL5 altera il pattern di splicing di un minigene adenovirale (E1A), causando un aumento di alcune isoforme di splicing alternativo e una diminuzione di altre. CDKL5 potrebbe avere quindi un ruolo nel regolare la mobilità del pool di proteine e complessi ribonucleoproteici coinvolti nello splicing, ma potrebbe anche avere un ruolo diretto nel regolare fenomeni di splicing alternativo (Ricciardi, Kilstrup-Nielsen et al. 2009).

4.6. Le mutazioni: dal genotipo al fenotipo

Sono note numerose mutazioni a carico del gene *CDKL5*. Alterazioni di tale gene sono correlate con lo sviluppo di una gamma complessa e sfumata di patologie: mutazioni del gene sono state trovate in pazienti affetti da una forma atipica della Sindrome di Rett, caratterizzata dalla presenza di crisi epilettiche ad esordio precoce, definita variante di Hanefeld o Encefalopatia Epilettica Infantile Precoce tipo 2 (OMIM

300672) o Sindrome da spasmi infantili dominante legata all'X. Mutazioni a carico di *CDKL5* sono state trovate anche in alcuni pazienti con un fenotipo molto simile alla Sindrome di Angelman (OMIM 105830). Infine, sono noti alcuni casi di bambine con mutazioni di *CDKL5* che presentano un fenotipo molto simile alla Sindrome di West, definita anche Encefalopatia Epilettica Infantile Precoce tipo 1 (OMIM 308350). Ad oggi sono state descritte più di 50 mutazioni patologiche a carico del gene *CDKL5*, che comprendono traslocazioni del locus contenente il gene sul cromosoma X, delezioni, inserzioni, mutazioni nonsense, mutazioni missenso. 27 di queste mutazioni sono di tipo nonsense e frameshift, e risultano in una prematura terminazione della traduzione del messaggero (per un elenco completo delle mutazioni si veda il database RettBASE <http://mecp2.chw.edu.au>). La prima alterazione storicamente riportata è stata trovata in due bambine affette da Encefalopatia Epilettica Infantile Precoce; si tratta di una traslocazione bilanciata tra il cromosoma X e un autosoma ($t(X;7)(p22.3;p15)$ o $t(X;6)(p22.3;q14)$), che in entrambi i casi distrugge il gene *CDKL5*. Lo stesso autore dimostra che il gene *CDKL5* è soggetto a silenziamento in seguito al fenomeno di inattivazione dell'X ; nelle due pazienti descritte la proteina è assente a causa dell'inattivazione preferenziale del cromosoma X contenente la copia normale del gene (Kalscheuer, Tao et al. 2003). In seguito sono state identificate numerose altre mutazioni a carico del gene, in pazienti affetti da Encefalopatia Epilettica Infantile precoce tipo 2 o da quadri patologici varianti della Sindrome di Rett, di cui la gran parte sono di tipo sporadico, si verificano al momento del concepimento o sono presenti nella linea germinale di uno dei genitori. Sono rari i casi di mutazioni di tipo familiare. Nel 2004 sono state descritte due mutazioni a carico del dominio

chinasico, che ne riducono la capacità catalitica: sono le sostituzioni missenso **C152F** (causata da una sostituzione di una G con una T in posizione 455) e **R175R** (causata dalla sostituzione di una A con una T in posizione 525)(Tao, Van Esch et al. 2004). La prima mutazione trovata in una maschio affetto da Encefalopatia Epilettica Infantile Precoce tipo 2 è stata individuata nel 2004; si tratta di una delezione di una base in posizione 183 (**183delT**), che provoca un frameshift della cornice di lettura e porta alla produzione di una proteina priva di attività troncata all'amminoacido 75 (Weaving, Christodoulou et al. 2004). Alcune mutazioni sul gene CDKL5 ne modificano la capacità di raggiungere la corretta localizzazione; una di queste è la sostituzione missenso **A40V**, causata dalla sostituzione di una C con una T in posizione 119 del gene. La proteina con questa mutazione è incapace di raggiungere il nucleo, e rimane confinata al citoplasma (Rosas-Vargas, Bahi-Buisson et al. 2008). Sono state inoltre descritte diverse mutazioni di tipo nonsense che portano alla formazione di codoni di stop prematuri, che hanno come conseguenza la produzione di proteine più o meno troncate, con caratteristiche alterate. Nel 2006 Nectoux e colleghi identificano una sostituzione di una citosina con una timina in posizione 2500 del messaggero, che risulta in una proteina troncata al residuo di glutammina 834 (**Q834X**) (Nectoux, Heron et al. 2006). La mutazione frameshift **S781fsx783** è causata dalla delezione di una base nell'esone 16 (C2343delG); tale delezione porta alla formazione di un codone di stop prematuro in posizione 781, con la formazione di una proteina tronca privata di parte del dominio carbossi-terminale (Δ C781) (Mari, Azimonti et al. 2005).

Numero mutazione	Mutazione	Effetto
300203.0001	183delT	Shift della cornice di lettura con la produzione di una proteina non funzionale troncata in posizione 75
300203.0002	IVS13	Shift della cornice di lettura e produzione di una proteina troncata in posizione 783
300203.0003	ARG152PHE	Riduzione dell'attività chinasica
300203.0004	ARG175SER	Riduzione dell'attività chinasica
300203.0005	166GAAA	Shift della cornice di lettura, produzione di una proteina troncata in posizione 74
300203.0006	del 2636CT	Shift della cornice di lettura, produzione di una proteina troncata in posizione 908
300203.0007	GLN834TER	Formazione di un codone di stop prematuro e produzione di una proteina troncata in posizione 834
300203.0008	IVS6	Alterazione di un sito di splicing e perdita dell'esone 7
300203.0009	ALA40VAL	Produzione di una proteina incapace di raggiungere il nucleo
300203.0010	ILE72THR	Non noto
300203.0011	THR288ILE	Alterazione dell'attività chinasica
300203.0012	CYS291TYR	Alterazione dell'attività chinasica
300203.0013	2 BP ins, 903	Shift della cornice di lettura e produzione di una proteina troncata alla fine del dominio N terminale
300203.0014	ARG178PRO	Ridotta produzione della proteina nelle fasi G0 e G1

5. Spettroscopia di Correlazione della Fluorescenza (FCS): Dalla FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) alla RICS (*Raster Image Correlation Spectoscopy*)

La spettroscopia di correlazione di fluorescenza è una tecnica di analisi di correlazione delle fluttuazioni di intensità della fluorescenza. È stata inizialmente introdotta da Madge, Elson e Webb negli anni '70 come metodo analitico per studiare le dinamiche chimiche dell'intercalazione di sostanze al DNA (Madge 1976). La tecnica non ebbe vasto successo finché non fu abbinata all'uso del microscopio confocale, che permise di superare i problemi di efficienza nel rilevare segnali anche molto bassi e le problematiche conseguenti ad un'insufficiente soppressione della fluorescenza di fondo, presenti con i microscopi precedenti. Rapidamente la FCS si affermò come metodo per studiare la cinetica chimica, la dinamica conformazionale, la concentrazione e lo stato di aggregazione e soprattutto la **diffusione** di molecole **fluorescenti** in soluzione o adese a membrane. Le applicazioni della FCS sono dunque numerose, sia in campo biologico che in altri campi. Sulla base del principio utilizzato per studiare un dato fenomeno si distinguono:

- Metodi basati sulla **perturbazione del sistema**: questi prevedono di alterare l'equilibrio iniziale del sistema, per poi valutare come il sistema ritorna ad un nuovo equilibrio (ad esempio, la FRAP, Fluorescence Recovery After Photobleaching);
- Metodi basati sulla misurazione delle **fluttuazioni del sistema all'equilibrio**: in questo caso il sistema non viene perturbato e si misurano le fluttuazioni del sistema all'equilibrio (ad esempio, la FCS tipica, la ICS,

Image Correlation Spectroscopy e la più recente RICS, Raster Image Correlation Spectroscopy).

In entrambi i casi, le tecniche di FCS permettono di studiare fenomeni biologici *in vivo*, o più propriamente su cellule vive, in modo dinamico, attraverso l'utilizzo di molecole marcate con fluorofori. Questo rappresenta un notevole vantaggio rispetto ad altre tecniche (come l'immunocitochimica) per cui sono richiesti passaggi di fissazione, che determinano la morte della cellula, e permettono solamente l'osservazione di una situazione statica.

Il primo principio su cui si basano tutte le tecniche di FCS è il Teorema di Fluttuazione-Dissipazione: secondo questo principio, la risposta di un sistema in **equilibrio termodinamico** a cui viene applicata una piccola perturbazione è paragonabile ad una fluttuazione spontanea. Perturbando un sistema all'equilibrio, questo ritornerà alla situazione iniziale con una tempistica caratteristica che dipende dal processo in atto, come farebbe in seguito ad una fluttuazione **spontanea** interna al sistema. In un sistema all'equilibrio, le **fluttuazioni** spontanee vengono **dissipate** con la stessa costante temporale delle fluttuazioni indotte dall'esterno.

Il secondo principio su cui si basano le tecniche di FCS si basa sull'osservazione che, in un volume aperto, le molecole o particelle fluttuano secondo una statistica poissoniana, quindi il numero medio di molecole rilevate dipende dalla **concentrazione** delle particelle e dalla dimensione del **volume**, e la varianza corrisponde al numero di particelle nel volume.

Il terzo principio base prevede che il numero di molecole “osservate” sia abbastanza basso tale che teoricamente ogni singola molecola contribuisca significativamente alle fluttuazioni di fluorescenza rilevate.

Nel caso delle tecniche non-perturbanti, come la RICS, si analizzano le fluttuazioni spontanee di fluorescenza interne al sistema all’equilibrio; nelle tecniche perturbanti, come la FRAP, le fluttuazioni di interesse sono quelle che si verificano nel sistema dopo che uno stimolo esterno ha perturbato l’equilibrio. Le fluttuazioni possono essere quantificate nella loro intensità e durata temporale autocorrelando temporalmente i segnali ricevuti. L’autocorrelazione fornisce una misura di somiglianza di un segnale con se stesso dopo un certo intervallo di tempo. La fluttuazione della fluorescenza viene studiata attraverso la **funzione di autocorrelazione**, che permette di confrontare il segnale ottenuto in un istante con quello ottenuto in un tempo successivo. Si definisce la fluttuazione del segnale dal suo valor medio come

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$$

mentre la funzione di autocorrelazione è definita come

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

dove il segnale di autocorrelazione risultante, $G(\tau)$, è calcolato come la somiglianza del segnale emesso dal fluoroforo al tempo t rispetto al segnale emesso dallo stesso al tempo $(t+\tau)$. La curva di autocorrelazione può essere approssimata con modelli matematici che forniscono informazioni qualitative sul tempo di diffusione (τ_D), sul numero di

molecole nel volume esaminato ($\langle N \rangle$), sul coefficiente di diffusione (D) o sulla *brightness* (η) (Tian, Martinez et al. 2011).

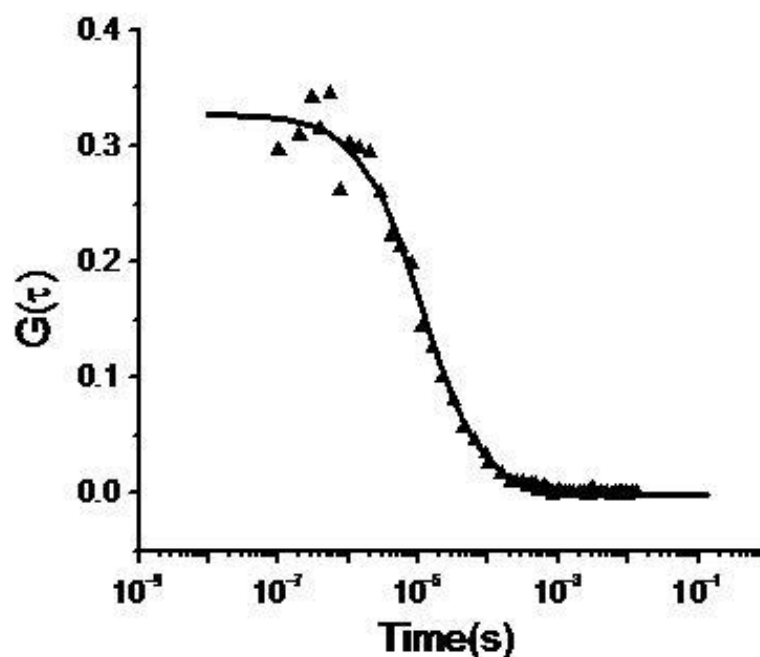


Figura 5. Rappresentazione grafica della funzione di autocorrelazione. Il segnale di autocorrelazione $G(\tau)$ è rappresentato in funzione del tempo.

5.1. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

La FRAP è un metodo che permette la determinazione della cinetica di diffusione di molecole in diffusione e in cellule vive. Si avvale della microscopia confocale in fluorescenza, come le altre tecniche FCS. La FRAP sfrutta la proprietà del fluoroforo GFP (o di un fluoroforo con proprietà analoghe) di essere irreversibilmente inattivato se irradiato con uno stimolo laser ad alta intensità. A livello metodologico, prevede di analizzare la dinamica di una molecola marcata con un fluoroforo

all'interno della cellula, producendo uno fotospegnimento della fluorescenza (un photobleaching) in una specifica area della cellula (il nucleo, o una porzione del citoplasma) attraverso eccitazione ad alta intensità con un laser dell'opportuna lunghezza d'onda, e di misurare poi il recupero del segnale nel tempo. Il recupero si verifica se le molecole fluorescenti si spostano all'interno della cellula, e vanno a rimpiazzare quelle "spente" in precedenza; il recupero avviene con una cinetica caratteristica per ogni molecola. La FRAP fornisce informazioni circa la mobilità e diffusività della molecola nella cellula e sulla cinetica di tale movimento. Come prima informazione, la FRAP permette, tramite il foto spegnimento di proteine all' interno del nucleo, di capire se una proteina si sposta dal nucleo al citoplasma e viceversa; in base alla dimensione della proteina, è anche possibile capire se questa oltrepassa la membrana nucleare per diffusione passiva, o se è sottoposta a trasporto attivo. Da un esperimento di FRAP viene ottenuto un grafico del recupero della fluorescenza, che viene opportunamente sottoposto a "*fitting*" matematico, e da cui si estrapolano due parametri:

- **Il T/2:** è il tempo impiegato perché la fluorescenza torni ad essere la metà della fluorescenza massima teorica. Poiché generalmente l'andamento del recupero della fluorescenza ha una cinetica esponenziale di primo o di secondo ordine, è impossibile calcolare la fluorescenza massima, punto in cui la curva raggiunge un plateau. Il valore del T/2 fornisce informazioni sulla cinetica del processo, e permette di capire se la molecola in esame si sposta rapidamente o lentamente all'interno della cellula; se la molecola recupera lentamente, o non recupera nei tempi presi in considerazione, è possibile ad esempio ipotizzare che sia legata a qualche struttura

(cromatina, membrane, complessi macromolecolari) o sia sequestrata all'interno di un compartimento subcellulare, o ancora che non sussistano meccanismi di trasporto attivo che la veicolano attraverso le membrane, qualora essa sia oltre il limite di diffusività; viceversa se il recupero è rapido è presumibile che la molecola sia libera di diffondere.

- **La frazione immobile:** Il recupero della fluorescenza non è necessariamente completo. Spesso la fluorescenza non ritorna ai livelli iniziali; il mancato recupero della fluorescenza è dovuto ad una percentuale di molecole che non sono libere di muoversi, e per questo non contribuiscono al recupero. La frazione di molecole che non contribuisce al recupero è detta frazione immobile. Maggiore è la frazione immobile, più (molto probabilmente) la proteina è legata a qualche struttura, sequestrata in qualche compartimento subcellulare o coinvolta nel legame con complessi immobili.

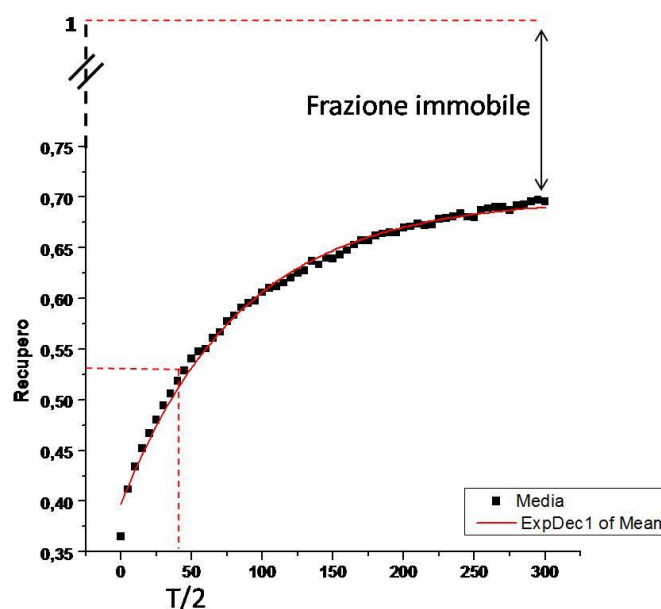


Figura 6. Rappresentazione grafica della cinetica del recupero della fluorescenza dopo fotospegnimento. Il recupero è rappresentato in funzione del tempo. È rappresentata anche la frazione immobile e il $T/2$.

5.2. RICS (Raster Image Correlation Spectroscopy)

La RICS è una tecnica non invasiva che permette di osservare e quantificare eventi in cellule, come la concentrazione e il coefficiente di diffusione di molecole marcate fluorescentemente. Inoltre, misurando le variazioni del coefficiente di diffusione, la RICS può indirettamente fornire informazioni sullo stato di legame di una molecola a strutture all'interno della cellula. È stata sviluppata da Digman e colleghi nel 2005 (Digman, Brown et al. 2005).

Le misure vengono effettuate acquisendo immagini della cellula attraverso l'uso di un microscopio confocale *laser scanning* e mediante *raster scanning* (il termine *raster* in italiano è tradotto reticolo, e in questo contesto significa che le acquisizioni vengono fatte attraverso l'uso di un laser che percorre linearmente la cellula in modo orizzontale, misurando da sinistra a destra, per tutta la larghezza della cellula, e poi tornando indietro da destra a sinistra senza effettuare misurazioni, per poi ricominciare con la linea sottostante). La scansione procede quindi un pixel alla volta, attraverso lo scorrimento del laser sul campione, e la fluorescenza emessa da ciascun punto viene rilevata dal laser stesso. Il pixel in questo caso può essere considerato come una regione del campione illuminata dal volume focale del laser. Poiché il principio della tecnica è quello di seguire le molecole che stanno diffondendo orizzontalmente, occorre che il volume focale venga campionato più volte, sovrapponendosi in parte alla posizione precedentemente misurata. Ciascun pixel viene perciò overcampionato.

L'analisi dei dati viene effettuata attraverso l'uso di opportuni software, e segue un procedimento in due fasi. La prima fase prevede la **sottrazione**

del rumore di fondo. Questa prima fase è necessaria poiché uno dei requisiti della RICS è che le molecole diffondano liberamente in soluzione (o in questo caso nella cellula) secondo i moti browniani; eventuali “movimenti lenti” causati dal legame delle molecole fluorescenti a membrane, vescicole o macroaggregati, interferiscono nel calcolo del coefficiente di diffusione, e devono pertanto essere sottratti. Per fare questo, si procede a calcolare la media di un certo numero di immagini, da 2 a 10, a seconda di quanto i movimenti lenti siano disturbanti, e a sottrarre tale media da tutte le immagini del gruppo. Questo consente di normalizzare la perturbazione introdotta dai movimenti lenti indesiderati.

La seconda fase è l’analisi vera e propria, e prevede il calcolo della funzione di autocorrelazione, usando l’equazione

$$G(\varepsilon, \psi) = \frac{\langle \delta i(x, y) \delta i(x + \varepsilon, y + \psi) \rangle_{x, y}}{\langle i(x, y) \rangle_{x, y} \langle i(x, y) \rangle_{x, y}}$$

dove $i(x, y)$ è l’intensità a ciascun pixel dell’immagine, ε e ψ rappresentano la correlazione di x e y nello spazio e $\delta(i) = i - \langle i \rangle$ e $\langle \dots \rangle_{x, y}$ è la media nello spazio di ciascuna immagine. Dall’analisi vengono estrapolati due parametri:

- D : è il coefficiente di diffusione, espresso in $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Fornisce una misura della mobilità di una molecola in un compartimento. Più è elevato, più la molecola è veloce; tale velocità può essere considerata inversamente proporzionale all’eventuale legame della molecola ad una membrana, un compartimento vescicolare o un complesso immobile. Se D è

significativamente elevato, presumibilmente la molecola non è legata ed è libera di diffondere in soluzione.

- G_0 : è una misura del numero di molecole in soluzione (Rossow, Sasaki et al. 2010).

Scopo della tesi

La Sindrome di Rett è una patologia del neurosviluppo i cui meccanismi patogenetici restano ancora in gran parte da chiarire. Il primo gene correlato alla patologia ad essere scoperto in ordine temporale è stato MeCP2, seguito da CDKL5 e, in ultimo, da FOXP1. Se da una parte esiste una considerevole quantità di dati e informazioni su MeCP2 e, in minor misura, su FOXP1, dall'altra esiste un vuoto informativo riguardo CDKL5. La struttura del gene, della proteina, ma soprattutto la sua funzione e il ruolo delle mutazioni patologiche sono stati solo in parte chiariti. Per questo motivo, lo scopo del mio lavoro si è concentrato sull'analisi di alcuni aspetti riguardanti questa proteina. In primo luogo è stata analizzata la localizzazione subcellulare di hCDKL5, sia delle forme wild type che di alcuni mutanti patologici. Successivamente, sono state applicate tecniche di spettroscopia di correlazione di fluorescenza come la FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) e la RICS (Raster Image Correlation Spectroscopy), utilizzando dei costrutti di fusione in cui il cDNA codificante per hCDKL5 è fuso al fluoroforo GFP (Green Fluorescent Protein). Queste analisi hanno permesso di ottenere informazioni preziose circa la cinetica di spostamento della proteina all'interno della cellula e la sua affinità per alcuni compartimenti cellulari. Infine, l'analisi delle forme mutanti a nostra disposizione ha permesso di individuare alcuni domini proteici importanti per il corretto funzionamento di hCDKL5.

***MATERIALI E
METODI***

1. Culture Cellulari

Il tipo cellulare prescelto per gli esperimenti è una linea di fibroblasti murini, le cellule NIH 3T3. Questa linea cellulare deriva originariamente da un espanto di tessuto embrionale di topo; la linea è stata realizzata da Todaro e Green nel 1962. Da allora, le cellule NIH 3T3 costituiscono una delle linee di fibroblasti di riferimento. Un altro tipo cellulare utilizzato nel periodo di tesi è quello delle SH-SY5Y, una linea di cellule derivate da un neuroblastoma umano.

1.1 Coltura e mantenimento

Le cellule NIH 3T3 sono state tenute in coltura con il terreno DMEM F12 addizionato con gli antibiotici Penicillina e Streptomicina al 10% e New Born Calf Serum al 10%. Le piastre utilizzate sono in plastica, trattata in modo particolare per garantire l'adesione delle cellule (trattamento Tissue Cult). Per il mantenimento delle cellule in coltura sono state utilizzate piastre con diametro da 35, 60 e 100 mm.

Terreno di coltura per NIH 3T3

DMEM F12

Penicillina e Streptomicina 10%

New Born Calf Serum 10%

Terreno di coltura per SH-SY5Y

RPMI 1640

Penicillina e streptomicina 10%

Fetal Bovine Serum 10%

1.2 Trypsinizzazione

Le cellule NIH 3T3 sono state trypsinizzate e ripiastrate ogni circa 3 giorni, o ad una confluenza dell'80%, con tripsina allo 0,05% in PBS. È stato utilizzato 1 ml di tripsina per un piastra da 5 cm di diametro e 0,5 ml per la piastra da 3 cm. La tripsina è stata applicata sulle cellule dopo aver eliminato il mezzo di coltura, è stata lasciata agire per 5' a 37°C ed è stata poi inattivata diluendola 5 volte con del mezzo di coltura fresco. Le cellule sono state ripiastrate ad una densità corrispondente ad 1/3 della densità di partenza.

1.3 Congelamento e scongelamento

Le cellule NIH 3T3 sono state congelate utilizzando un protocollo che prevede di staccare le cellule dalla piastra mediante trattamento con tripsina, centrifugarle in un tubo Falcon da 15 ml per 5' a 1100 x g e risospenderle in 1,5 ml di Freezing Solution. Le cellule così risospese sono state trasferite in una Cryo Vial e congelate a -80°C. Lo scongelamento prevede di prelevare il tubo Cryo Vial dal congelatore a -80°C e di scongelare le cellule in una bagnetto a 37°C. Le cellule così scongelate vengono poi centrifugate in un tubo Falcon da 15 ml per 5' a 1100 x g per

rimuovere la Freezing Solution contenente il DMSO. Una volta rimossa la Freezing Solution le cellule sono state risospese in DMEM F12 + New Born Calf Serum 10% , piastrate in un'apposita piastra Tissue Cult e lasciate crescere a 37°C.

Freezing Solution

Terreno di coltura DMEM F12

New Born Calf Serum 10%

DMSO (DiMetilSulfOssido) 10%

1.4 Conta

Per piastrare un numero preciso di cellule, è stato talvolta necessario contarle. Per far questo, 10 µl di cellule in sospensione sono state depositate all'interno della Camera di Burkner, una camera per la conta delle cellule costituita da un reticolato di 3x3 quadrati. Si procede alla conta di almeno 3 quadrati all'interno della camera, e si fa poi la media. Tale camera raccoglie un volume di 1/10 di mm³. In questo modo è possibile risalire al numero di cellule presenti in 1 ml di coltura e conoscerne la concentrazione.

2. Immunocitochimica

I vetrini da 10 mm sono stati sterilizzati in EtOH 70%, lasciati asciugare 1 h sotto la lampada ad UV e successivamente depositati in una piastra per colture cellulari "12-well". Su ciascun vetrino sono state piastrate 5×10^4 cellule NIH 3T3. Le cellule sono state lasciate aderire e crescere per 24 h in terreno DMEM F12 addizionato con Penicillina e Streptomicina 10% e New Born Calf Serum 10%. Il giorno successivo si è proceduto alla fase di fissazione. È stato aspirato dai pozzetti il mezzo di coltura e le cellule sono state fissate con Paraformaldeide all' 1% per 20' a RT; in seguito, è stata rimossa la soluzione di fissazione ed è stato effettuato il bloccaggio e la permeabilizzazione, con una soluzione contenente FBS al 5%, Triton allo 0,2% in PBS. La soluzione è stata lasciata ad incubare sui vetrini per 1 h a RT. La soluzione di bloccaggio e permeabilizzazione è stata rimossa ed è stata effettuata l'incubazione con l'anticorpo primario anti-hCDKL5. In questa fase è stato utilizzato l'anticorpo policlonale della Sigma Aldrich prodotto in coniglio (REF HPA002847), alla concentrazione di 1:100. L'anticorpo è stato diluito in una soluzione con 5% di FBS, 0,1% di Triton in PBS. L'anticorpo è stato lasciato agire O/N a 4°C. Il giorno seguente è stata rimossa la soluzione con l'anticorpo e sono stati effettuati 3 lavaggi da 5' in PBS freddo. L'anticorpo secondario utilizzato è un policlonale anti-coniglio coniugato al fluoroforo Alexa 546. È stato utilizzato 1:1000 in FBS al 5% e Triton allo 0,1% in PBS. L'incubazione è stata lasciata proseguire per 1h a RT. Per rimuovere l'eccesso di anticorpo e bloccare l'incubazione, dopo 1 h sono stati effettuati 3 lavaggi da 5' con PBS freddo. Infine, i vetrini circolari sono stati montati su vetrini portaoggetto 24x60

mm con l'uso del Vectashield. Una volta asciugato il Vectashield, i vetrini sono stati sigillati con dello smalto per unghie.

Soluzione di fissazione

Paraformaldeide 1% in PBS

Soluzione di bloccaggio e permeabilizzazione

FBS 5%

Triton 0,2%

PBS

Soluzione di incubazione dell'anticorpo primario

FBS 5%

Triton 0,1%

Anticorpo primario policlonale anti hCDKL5 1:100

PBS

Soluzione di incubazione dell'anticorpo secondario

FBS 5%

Triton 0,1%

Anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con Il fluoroforo Alexa 546

1:1000

PBS

Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale laser Leica nella configurazione dritta, utilizzando un obbiettivo 40X/1,25 ad olio. Tutte le immagini sono state acquisite con gli stessi parametri (intensità del laser 543 30%, PinHole 200 μm^2 , formato delle immagini 1024x1024 pixel, con 4 medie sulle linee).

3. Preparazione delle cellule per gli esperimenti di FRAP e RICS

3.1 Preparazione dei vetrini

Per l'osservazione di cellule vive sono state utilizzate speciali piastre che consentono l'osservazione al microscopio confocale invertito. Tali piastre hanno un diametro di 3,5 mm ma possiedono al centro un piccolo pozzetto di vetro di 12 mm di diametro che consente alla luce di attraversarlo permettendo l'osservazione delle cellule adese sul fondo di esso. A tal fine, sono state utilizzate le piastre WillCo-dish® GLASS BOTTOM DISHES (REF HBSt-3512). La capacità del pozzetto centrale è di 150 µl, quella della piastra intera di 1,5 mL.

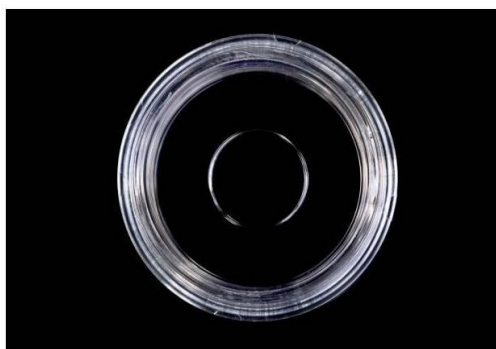


Figura 7. Immagine di una piastrina WillCo-dish.

Le cellule NIH 3T3 sono state piastrate nel pozzetto centrale alla densità di $1,5-2 \times 10^4$ e lasciate ad aderire per 24-48 ore.

3.2 Trasfezione con il metodo della Lipofectamina

Per allestire gli esperimenti di dinamica molecolare in cellule viventi, sono stati utilizzati dei costrutti di fusione contenenti la GFP. Per avere delle

cellule che esprimessero in modo transiente tali costrutti, le cellule sono state trasfettate con il metodo della lipofectamina. Per l'allestimento di tale tecnica si procede ad una serie di passaggi:

- Inizialmente sono state preparate due soluzioni separate, una contenente il DNA plasmidico (1-5 µg) unito al terreno OPTIMEM (80 µl); l'altra contenete la Lipofectamina (Lipofectamina TM 2000 Transfection Reagent della ditta Invitrogen, REF 11668-027), 2µl, addizionata a terreno OPTIMEM (80 µl) .
- Le due soluzioni, opportunamente agitate, sono state lasciate 10 ' a RT a riposare.
- Successivamente, le due soluzioni sono state addizionate, mescolate, e lasciate immobili a RT per 30'. Durante questa fase il DNA viene internalizzato dai liposomi.
- Una volta che il DNA si è inserito all'interno dei liposomi, i 160 µl di soluzione sono stati applicati sulle cellule all'interno del pozzetto centrale di una Willco-Dish da 35 mm preventivamente preparata con le cellule adese nel pozzetto centrale. Le cellule sono state lasciate a 37°C per 1h e 30' per consentire ai liposomi di permeabilizzare la membrana plasmatica e riversare all'interno delle cellule il DNA plasmidico.
- Per arrestare la trasfezione, trascorso il tempo necessario, è stata rimossa la soluzione di OPTIMEM contenente i liposomi e le cellule sono state lavate una volta con 200 µl di DMEM F12 + New Born Calf Serum. La piastra è stata riempita con 1 mL di mezzo di coltura e le cellule sono state riposte nell'incubatore a 37°C. Dopo 24 h, le cellule, che nel frattempo hanno avuto il tempo di esprimere le proteine di fusione, sono state utilizzate per gli esperimenti successivi.

4. Microscopia a Fluorescenza: Microscopio Confocale

4.1 Acquisizione delle immagini e analisi di un esperimento di FRAP

Per gli esperimenti di FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) è stato utilizzato un microscopio confocale laser Leica DM IRE2, nella configurazione invertita, impiegando un obbiettivo 40X/1,25 ad olio, con l'ausilio del software Leica Confocal Software. Le immagini preliminari sono state acquisite con i medesimi parametri (laser al 30%, PinHole a 200 μm^2 , Gain a 500 e OffSet a 0x, formato 1024x1024 pixel, 4 medie sulle linee). L'acquisizione delle immagini di FRAP è stata invece eseguita impostando il laser al 100%, il Pinhole completamente aperto, frequenza di scansione 400 Hz, Gain 500 e Offest 1x, formato 512x512 pixel, zoom 5-7x. Il fotospegnimeneto è stato effettuato disegnando una ROI a livello del nucleo.

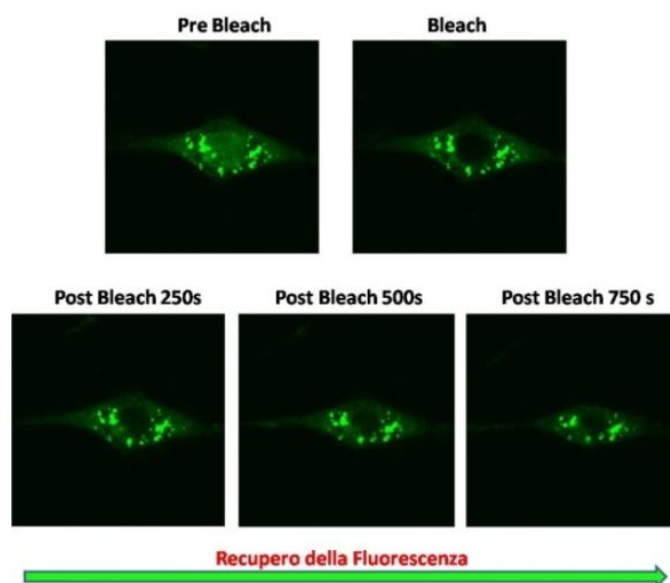


Figura 8. Schema delle fasi di Prebleach, Bleach e Postbleach di un esperimento di FRAP su cellule NIH 3T3.

Come parametri dell'esperimento, è stato scelto di acquisire 4 frames di Prebleach della durata di 1,6 secondi ciascuno. Il Bleach, a livello del nucleo, è stato effettuato per 3 secondi, ripetuto per 6 frames. Infine il recupero della fluorescenza è stato seguito per 150 frames, ognuno preso ogni 5 secondi, per un totale di 12' e 50'' di fase di Postbleaching.

I dati così acquisiti sono stati analizzati in due fasi. La prima fase viene effettuata mediante il Leica Confocal software. Durante questa prima fase sono stati calcolati i valori di fluorescenza del nucleo, del citoplasma e del background di ciascun frames, a livello del Postbleach e a livello del Prebleach. Nella seconda fase i valori medi di fluorescenza sono stati analizzati con il software Origin 8.0. Durante questa fase viene calcolata la cinetica del recupero della fluorescenza in funzione del tempo. In base al grafico così elaborato, vengono calcolati il $T/2$, che corrisponde al tempo, espresso in secondi o millisecondi, a cui l'area fotospenta ha raggiunto la metà della fluorescenza massima, e la frazione immobile, ovvero quella quota di proteina che, rimanendo legata, non permette un recupero completo della fluorescenza a livello dell'area fotospenta.

4.2 Acquisizione delle immagini e analisi di un esperimento di RICS

Questa tecnica permette di ottenere informazioni circa la diffusività delle proteine e, indirettamente, del loro stato di legame a complessi macromolecolari. Cellule NIH 3T3 esprimenti le proteine fluorescenti sono state analizzate 24 ore dopo la trasfezione.

Per ogni esperimento di RICS sono state acquisite 120 immagini. Gli esperimenti sono stati realizzati con un microscopio confocale Olympus FV10 ASW-2.1. In ogni acquisizione sono stati utilizzati gli stessi

parametri. La modalità di acquisizione è stata impostata su Raster Scan (in questa modalità l'area di interesse viene scansionata in senso orizzontale solamente da sinistra a destra). Il pixel-time, che corrisponde alla velocità di scansione, è stata impostata su 20 $\mu\text{s}/\text{pixel}$; tale velocità è stata empiricamente valutata come la più simile alla reale velocità di diffusione di hCDKL5 in esperimenti preliminari. La risoluzione è stata impostata a 256x256 pixel; il laser, 488, è stato utilizzato alla potenza dello 0,6%. Il filter mode è stato settato su Photon Counting.

L'analisi è stata effettuata grazie all'ausilio del software SIM FCS elaborato da Rossow e colleghi (Rossow, Sasaki et al. 2010) (vedi Figura 9). Per estrapolare il coefficiente di diffusione, dapprima vengono caricate le immagini sul software. I movimenti "lenti" sono stati normalizzati con una moving average variabile, da 10 a 2 (utilizzare una MA di 10 significa che ogni 10 frames è stata calcolata la media e questa è stata sottratta a ciascun frame). Successivamente è stata selezionata la dimensione dell'area da sottoporre all'analisi (che può essere 256, 128 o 64 pixel). A seconda delle esigenze, durante l'analisi sono state utilizzate tutte e tre le dimensioni.

Per eseguire l'analisi, sono stati impostati i seguenti parametri:

Dimensione dell'area da analizzare	32 pixel
Pixel Time	20 $\mu\text{s}/\text{pixel}$
Line time	6,24 ms
Frame time	1 s
Pixel size	0,05
Diametro del volume focale	0,23 μm

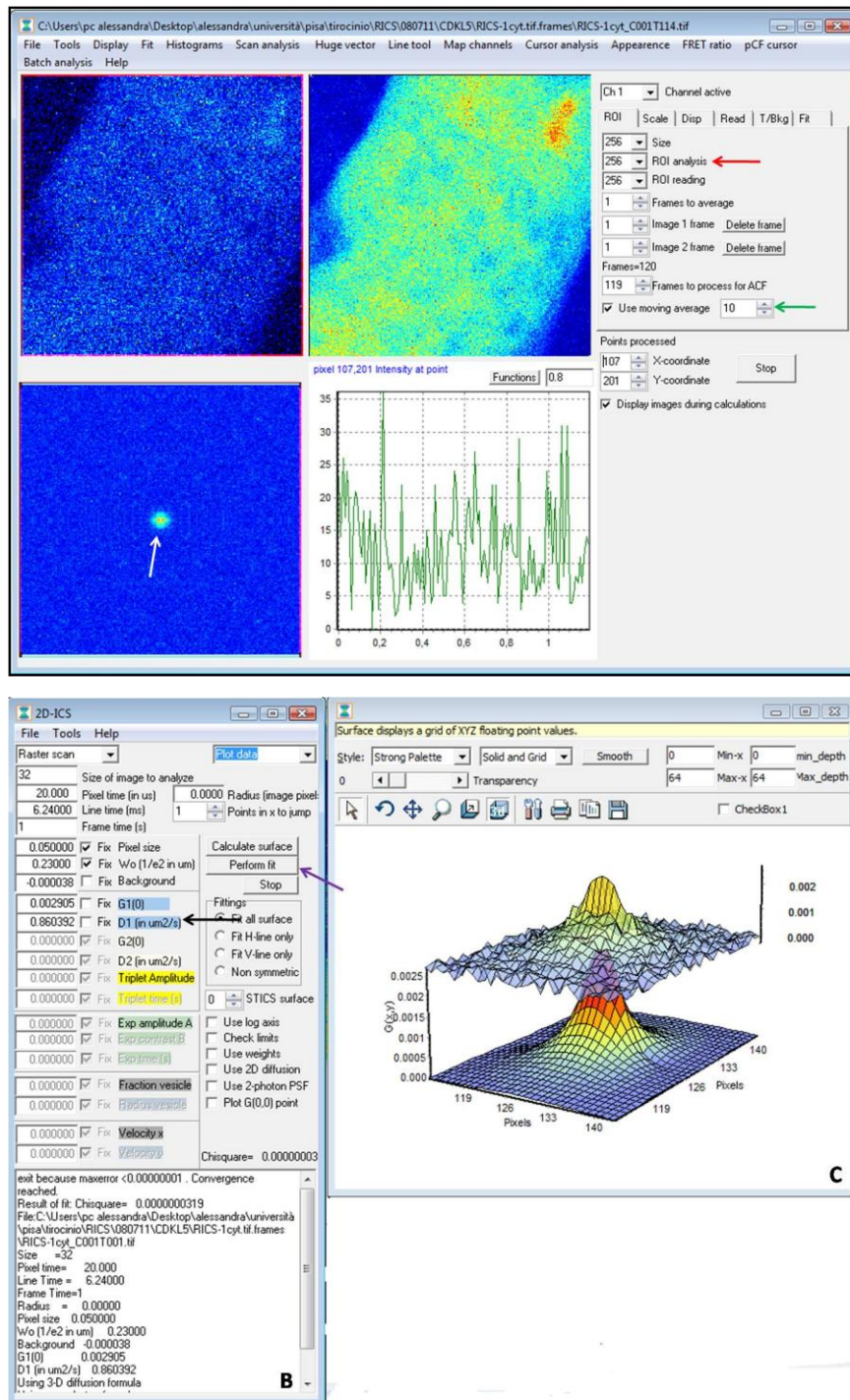


Figura 9. Immagini dal software di analisi RICS Sim FCS. Pannello A) I frames vengono caricati. Si sceglie l'opportuna *moving average* (freccia verde). Si seleziona la dimensione dell'area da analizzare (freccia rossa) e il programma restituisce l'analisi rappresentata da una curva a campana vista dall'alto, che rappresenta la correlazione di fluorescenza per la cellula in esame (freccia bianca). Pannello B) Il passo successivo prevede di effettuare il fitting matematico, cliccando su *Perform Fit* (Freccia viola). Il software elabora il parametro di interesse, il coefficiente di diffusione D , riportato nella casella indicata dalla freccia nera. Pannello C) Rappresentazione grafica dell'analisi. La curva superiore rappresenta il dato non corretto, la curva sottostante il dato opportunamente fittato.

L'analisi permette di estrapolare due parametri: il D , o coefficiente di diffusione, informa circa la velocità con cui una molecola diffonde all'interno di un compartimento subcellulare; $G0$ è invece un parametro che correla indirettamente con il numero di molecole in soluzione. Il coefficiente di diffusione D fornisce informazioni indirette anche sullo stato di legame della proteina analizzata ad un subcompartimento cellulare: maggiore è D , maggiore sarà la diffusività della molecola, che sarà verosimilmente libera di muoversi; valori di D piccoli sono indice di una situazione in cui la proteina è meno libera di diffondere, idealmente a causa di uno stato di legame ad una qualche struttura del compartimento analizzato. L'analisi è stata eseguita sia sul compartimento nucleare che su quello citoplasmatico.

4.3 Trattamento con il marcatore lisosomiale LysoTracker

Il marcatore lisosomiale LysoTracker® Red DND-99 (L-7528) consente di marcare in modo specifico lisosomi e organuli a pH acido in cellule viventi. Consiste di un fluoroforo che emette nelle lunghezze d'onda del rosso (577-590 nm), legato ad una base debole che è solo parzialmente protonata a pH neutro; questo le consente di passare facilmente la membrana lisosomiale. La base ha elevata affinità per gli organuli acidi. Il LysoTracker è stato utilizzato alla concentrazione finale di 50 nM, diluito nel mezzo di coltura. È stato lasciato ad incubare per 30' a 37°C sulle cellule, ed è stato poi rimosso sostituendo il mezzo di coltura delle cellule. Per osservare la marcatura, le cellule sono state osservate ad un microscopio confocale Leica DM IRE2, utilizzando un laser di eccitazione della lunghezza d'onda appropriata (543 nm).

5. Vettori

I vettori utilizzati in questa tesi contengono tutti il cDNA di hCDKL5 nelle forme wild type da 115kDa e da 107kDa, e nelle forme mutanti Δ C525, Δ C781, C152F e R175S clonati all'interno dei vettori Clontech pEGFPC1 (figura 10) o pEGFPN1 (figura 11). I vettori pEGFPN1 e pEGFPC1 sono entrambi lunghi 4,7 kilobasi, contengono la sequenza codificante la GFP, una regione contenente numerosi siti riconosciuti da enzimi di restrizione (MCS) utili per il clonaggio, un'origine di replicazione batterica (F1 ORI), un promotore forte per l'espressione dei prodotti clonati (CMV), la resistenza all'antibiotico kanamicina e il segnale di poliadenilazione di SV40. L'unica differenza tra i due plasmidi risiede nella posizione del Multiple Cloning Site, che condiziona il punto in cui avviene il clonaggio dell'inserito, e di conseguenza dove sarà tradotta la GFP: nel caso del pEGFPC1, il MCS si trova all'estremità carbossi-terminale della GFP, quindi l'inserito verrà a essere tradotto a valle della GFP. Nel caso del pEGFPN1 il MCS si trova prima, all'estremità ammino terminale della GFP, quindi la proteina di fusione sarà composta prima dalla proteina codificata dall'inserito, seguita a valle dalla GFP.

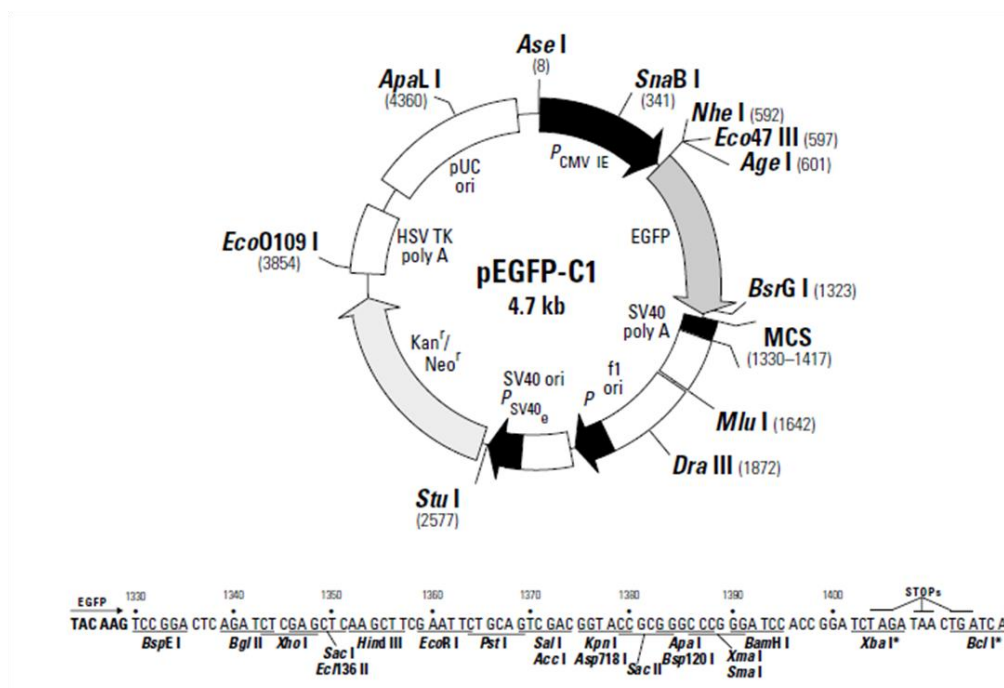


Figura 10. Il vettore pEGFPC1.

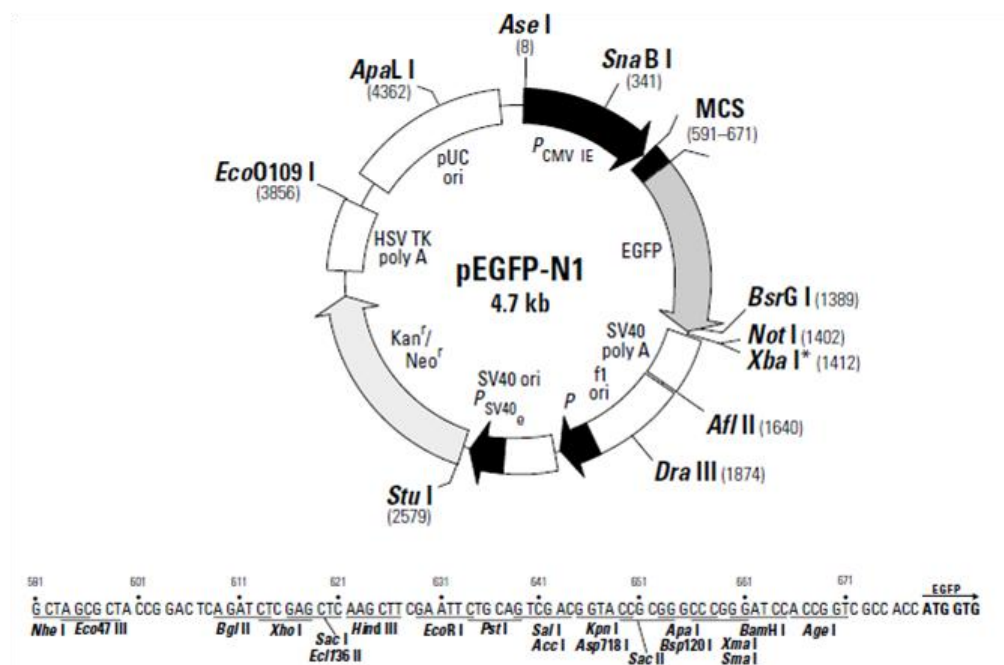


Figura 11. Il vettore pEGFPN1.

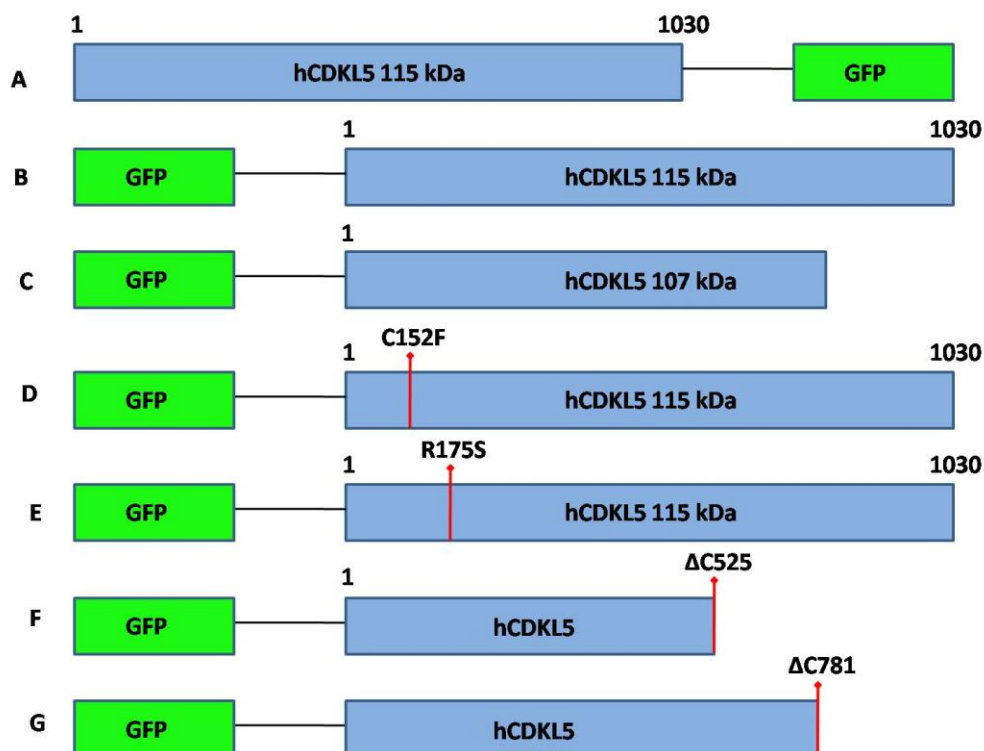


Figura 12. Rappresentazione schematica dei costrutti utilizzati in questa tesi. Il vettore raffigurato in A contiene il cDNA di hCDKL5 clonato all'interno del vettore pEGFPN1; i vettori da B a G sono realizzati in pEGFPC1, e sono stati concessi da Landsberger N.

Come template per l'amplificazione del cDNA di hCDKL5 è stato utilizzato il vettore contenente tale cDNA all'interno del vettore pFC8A (per concessione di Landsberger N.):

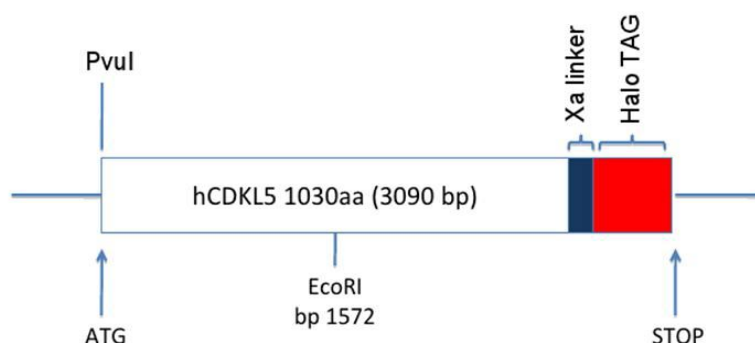


Figura 13. Rappresentazione schematica del vettore pFC8A contenente il cDNA di hCDKL5.

Infine, per il clonaggio dei prodotti di PCR è stato utilizzato il vettore pCR 2.1 allegato al T-A cloning kit. Le proprietà di tale vettore sono descritte nel paragrafo Materiali e Metodi 6.9 A.

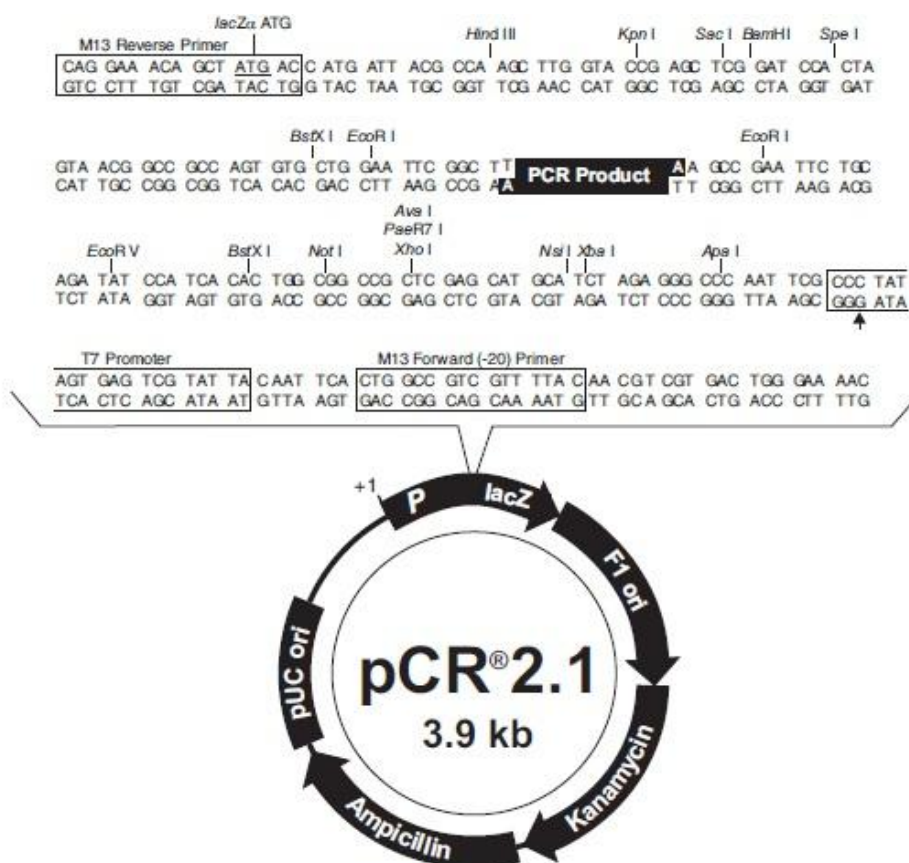


Figura 14. Vettore pCR 2.1.

6. Realizzazione del vettore pEGFPN1- hCDKL5¹¹⁵

Il plasmide di partenza pFC8A, così come tutti gli altri plasmidi nel corso del periodo di tirocinio, è stato trasformato in cellule competenti del ceppo DH5 α di *E. Coli*.

6.1 Preparazione delle cellule competenti

La trasformazione dei costrutti plasmidici in cellule di *Escherichia Coli* rese competenti all'acquisizione di plasmidi rende possibile la replicazione di tali costrutti allo scopo di ottenerne quantità sufficienti. Nel nostro laboratorio si utilizzano cellule di *E. Coli* del ceppo DH5 α , rese chimicamente competenti.

Per rendere le cellule batteriche chimicamente competenti si prende una colonia di DH5 α e si fa crescere in 1 ml di LB in agitazione a 37°C O/N. La crescita viene poi inoculata in 100 ml di LB e messa ad agitare a 37°C fino a che la densità cellulare raggiunge 4-7x10⁷ cellule/ml, ossia una OD₅₀ tra 0.45 e 0.55. A questo punto la coltura viene messa in tubi di polipropilene da 50 ml, posti in ghiaccio per 10-15' e centrifugati a 750-1000 x g per 12-15'a 4°C. Il precipitato ("pellet") di cellule viene asciugato invertendo i tubi su una pila di carta e, se necessario, rimuovendo il liquido rimasto con una micropipetta. Il "pellet" viene poi risospeso in un volume della soluzione RF1 pari a 1/3 del volume iniziale; la sospensione cellulare viene incubata in ghiaccio per 15' e centrifugata di nuovo come sopra. Il "pellet" ottenuto viene asciugato e risospeso in un volume di RF2 pari a 1/12.5 di quello originale. Le cellule vengono messe in ghiaccio per 15' e aliquotate in tubi da 1.5 ml ghiacciati e conservate a -80°C fino al momento dell'uso.

Una delle aliquote viene utilizzata per trasformarvi una quantità nota di un plasmide per valutare la competenza delle cellule batteriche ottenute.

6.2 Trasformazione batterica

Per trasformare le cellule di *E. Coli* competenti con DNA plasmidico è sufficiente aggiungere, ad un'aliquota di 100 µl di cellule competenti, una quantità di plasmide superavvolto adeguata alla competenza delle cellule e incubare in ghiaccio per 30'. Nel caso si desideri trasformare il prodotto di una ligation, nell'impossibilità di quantificare il plasmide, si utilizzano 7,5 µl della reazione. Segue un "heat-shock" a 42°C, per 30'', ed un'incubazione in ghiaccio per 5 min. Si aggiungono, successivamente, 900 µl di LB, si incuba nell'agitatore a 37°C per 60' ed infine si piastrano le cellule su terreno solido selettivo (LB con agar e antibiotico appropriato). Dopo incubazione a 37°C per tutta la notte, sulla piastra Petri compaiono le colonie: l'antibiotico fa sì che crescano solo le cellule che hanno assunto il plasmide poichè esso contiene il gene che conferisce la resistenza a quell'antibiotico.

Questa procedura è stata usata per trasformare il vettore di partenza hCDKL5-pFC8A e per tutte le fasi successive del clonaggio, ad eccezione della trasformazione delle ligation nel vettore pCR2.1, che è stata effettuata con i componenti del kit T-A cloning kit (vedi paragrafo Materiali e metodi 6.9 C).

Luria-Bertani Broth (LB)

NaCl 1%

Bacto-tryptone 1%

Bacto-yeast extract 0,5%

RF1

RbCl 100mM

MnCl₂ 4H₂O 50mM

Acetato di potassio 30mM

CaCl₂ x2H₂O 10mM

Glicerolo 15%

(pH finale 5.80)

Aggiustare il pH a 5.8 con 0.2M acido acetico. Sterilizzare mediante filtrazione.

RF2

MOPS 10mM

RbCl 10mM

CaCl₂ x2H₂O 75mM

Glicerolo 15%

Aggiustare il pH a 6.8 con NaOH e sterilizzare per filtrazione.

6.3 Estrazione del DNA plasmidico mediante kit commerciale QIAprep Spin Miniprep

Questa metodica consente di purificare fino a 20 µg di DNA plasmidico di un plasmide ad alto numero di copie. Come prima cosa, occorre preparare

5 ml di coltura batterica O/N di cellule di *E. Coli* in LB opportunamente trasformate con il DNA plasmidico d'interesse. La mattina successiva, si procede a centrifugare 3,5 ml della crescita per 5' a 10000 x g. Dopo la rimozione del mezzo di crescita, il pellet viene risospeso in 250 µl di Buffer P1, e il tutto è trasferito in un nuovo tubo da 2 ml. Si procede ad aggiungere 250 µl di Buffer P2, e ad agitare per inversione 4-6 volte. In questa fase avviene la lisi delle membrane batteriche, evidenziata dalla presenza del reagente LyseBlue aggiunto al Buffer P2, che dà una colorazione blu alla miscela. Si lascia ad incubare per non più di cinque minuti, e si procede poi ad aggiungere 350 µl di Buffer N3, che agisce bloccando la lisi. L'avvenuta neutralizzazione della lisi è segnalata dal cambio di colore della miscela, che da blu diventa bianca; si miscela per inversione 4-6 volte per assicurarsi che la miscela assuma la colorazione bianca in modo omogeneo. A questo punto si procede a centrifugare per 10' a 13000 rpm. Il supernatante viene poi rovesciato all'interno di una delle apposite colonnine cromatografiche fornite insieme al kit. Le colonnine vengono centrifugate per 1' alla massima velocità. Il *flowthrough* (cioè ciò che è passato attraverso il filtro della colonnina senza legarsi) viene scartato, e alla colonna vengono applicati 750 µl di Buffer PE, che serve a lavare la colonnina da ciò che si è legato in maniera aspecifica. Si centrifuga ancora una volta per 1' alla massima velocità. Si scarta il *flowthrough* e si ripete l'ultimo step per eliminare ogni eventuale residuo di Buffer PE. Infine, si procede all'eluizione, applicando alla colonnina 50 µl di acqua bidistillata. Si centrifuga 1' alla massima velocità, e in questo modo si consente al DNA plasmidico di staccarsi dalla colonna, a causa del cambiamento delle condizioni di salinità.

6.4 Estrazione del DNA plasmidico mediante il kit commerciale QIAGEN Plasmid Maxi kit

Questa procedura consente di purificare fino a 500 µg di plasmide ad alto numero di copie, a partire da una coltura batterica cresciuta O/N in 200 ml di LB. In questo caso, si parte da una singola colonia selezionata su terreno solido selettivo, che viene inizialmente inoculata in 5 ml di LB con l'apposito antibiotico e lasciata crescere per 3-4 h a 37°C; 1 ml di tale prescescita viene poi reinoculato in 200 ml di LB e antibiotico e lasciata crescere O/N a 37°C. La procedura è molto simile a quella illustrata al paragrafo 6.3, ma in questo caso gli steps che nel caso precedente vengono effettuati con la centrifuga, in questo caso vengono sostituiti dall'uso di un dispositivo che sottopone le colonne al vuoto. Inoltre, in questo caso, il primo passaggio in centrifuga viene effettuato per 15' a 6000 x g in una centrifuga refrigerata a 4°C.

6.5 Quantificazione del DNA plasmidico attraverso l'utilizzo di tecniche spettrofotometriche

In seguito all'estrazione, il DNA plasmidico è stato quantificato attraverso tecniche spettrofotometriche e attraverso quantificazione su gel di agarosio. Nel primo caso, 2 µl della preparazione plasmidica sono stati quantificati al NanoDrop. Tale strumento, in modo analogo allo spettrofotometro tradizionale, calcola la densità ottica di DNA in soluzione attraverso il calcolo dell'assorbanza quando il campione è eccitato da un raggio incidente con una lunghezza d'onda di 260 nm. Il vantaggio di tale sistema rispetto alle tradizionali tecniche

spettrofotometriche è la riduzione del volume di campione necessario per la lettura (1-2 µl sono sufficienti), poiché sfrutta la tensione superficiale prodotta da questo piccolo film di liquido, che viene posto a diretto contatto con le fibre ottiche che emettono il raggio luminoso.

6.6 Quantificazione del DNA plasmidico attraverso corsa elettroforetica

In questo caso la tecnica consente una quantificazione di tipo semiquantitativo: il campione di DNA da quantificare viene corso su un gel di agarosio insieme ad un marker di pesi molecolari a concentrazioni note: attraverso il raffronto della banda del campione a concentrazione ignota con le bande del marker, è possibile quantificare in modo semiquantitativo il DNA plasmidico.

6.7 Corsa elettroforetica su gel d'agarosio

Al fine di verificare la purezza del DNA estratto, il grado di completezza raggiunto dalla digestione del DNA, nonché di stimare la concentrazione del DNA nelle preparazioni e la lunghezza in paia basi del DNA, si prepara un gel di agarosio all' 1-1.5% (peso/volume). I gel sono preparati sciogliendo l'agarosio in TBE, portato alla temperatura di ebollizione. Prima che il gel polimerizzi si aggiunge bromuro di etidio (EtBr) 1:10000. Il gel, lasciato un poco a raffreddare, viene colato in un lettino da elettroforesi di un apparato orizzontale. Una volta polimerizzato, il gel è posto nell'apparato ed immerso in un tampone di corsa, TBE a pH8. Frattanto si preparano i campioni che vengono diluiti in H₂O Elix e "loading buffer". La funzione del "loading buffer" è di appesantire il

campione, grazie alla presenza del glicerolo, facendolo andare sul fondo del pozzetto, e consentire al contempo di seguire la corsa elettroforetica. Si caricano i campioni su gel e si applica una differenza di potenziale di 50/120 V per un tempo variabile a seconda delle dimensioni del DNA e della concentrazione del gel. Si visualizzano infine le bande del DNA ponendo il gel sotto un trans illuminatore a raggi UV; il bromuro di etidio che si è intercalato alle basi appare in queste condizioni luminescente. Le dimensioni dei frammenti sono stimate in presenza di marcatori con peso molecolare noto.

TBE pH 8.0

Tris base 0.089 M

Acido borico 0.089 M

EDTA 0.002 M

Loading buffer 6X

Glicerolo 5%

Blu di bromofenolo 0.05%

Xilene cianolo 0.05%

Gel di agarosio

Agarosio 0.8-1.5% (p/v)

Bromuro di etidio 1: 10'000 (v/v)

TBE 1X

6.8 Amplificazione per PCR

Il cDNA di hCDKL5 è stato amplificato per PCR a partire dal costrutto hCDKL5-pFC8A. A tal fine sono stati appositamente disegnati dei primer specifici forniti di code contenenti i siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione utilizzati ai fini del clonaggio:

Primer 1A : 5'-CTCGAGCGATCGCCATGAAGATTCCTAAC-3'

Primer 1B : 5'-GGTTGGGCTGGTGGGAGAATTCAAGTC-3'

Primer 2A : 5'-GACTTGAATTCTCCCACCAGCCCAACC-3'

Primer 2B : 5'-GGATCCTTGCCCGTCAGTGCCGCATTC-3'

Sono state allestite due reazioni di amplificazione. Nella prima, sono stati utilizzati i primer 1A e 1B, per amplificare la prima parte del cDNA di hCDKL5 (dalla posizione 1060 alla posizione 2632 del vettore hCDKL5-pFC8A, sito di riconoscimento per EcoRI, posizioni 1-1572 della sequenza codificate di hCDKL5). Le condizioni di PCR utilizzate sono illustrate in figura 15.

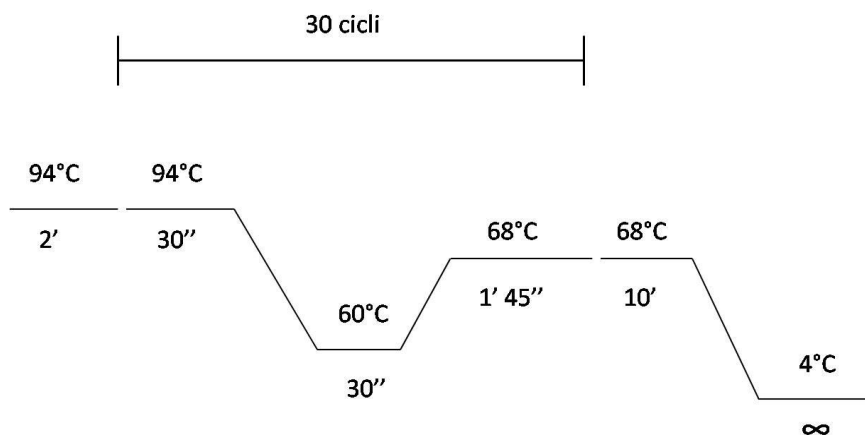


Figura 15. Rappresentazione schematica della reazione di amplificazione per PCR della prima parte di hCDKL5.

Nella seconda reazione di amplificazione sono stati utilizzati i primer 2A e 2B, che hanno permesso l'amplificazione della seconda parte del cDNA di hCDKL5, dalla posizione 2633 alla posizione 4151 del vettore hCDKL5-pFC8A, corrispondenti alle posizioni 1572-3087 della sequenza codificante hCDKL5. Le ultime tre paia di basi, corrispondenti ad un codone di stop (TGA) sono state escluse dall'amplificato, in modo tale che, una volta clonato il cDNA di hCDKL5 all'interno del vettore pEGFPN1, la traduzione prosegue con la GFP.

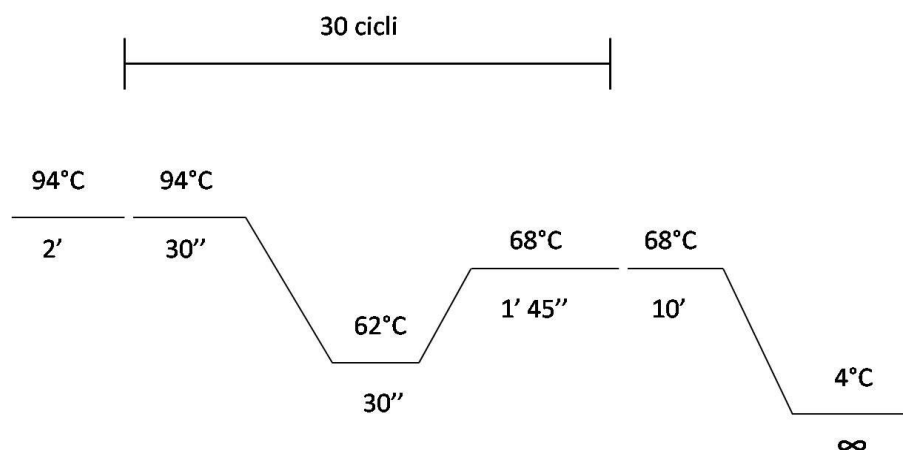


Figura 16. Rappresentazione schematica della reazione di amplificazione per PCR della seconda parte di hCDKL5.

In entrambe le reazioni è stato utilizzato l'enzima Platinum Taq Dna Polimerasi della ditta Invitrogen (REF 10966-018). Questo enzima amplifica il DNA in modo estremamente fedele, poiché è dotato di attività proof-reading (attività esonucleasica 3'-5') ed è hot-start (il che significa che non è attivo a temperatura ambiente, quindi è meno soggetto a formare amplificati aspecifici durante l'allestimento della reazione). Inoltre possiede un'attività terminal transferasica templatolo-indipendente che determina l'aggiunta di una singola Adenina all'estremità 3'-OH dei

prodotti di PCR. Tale attività è stata sfruttata per clonare i due frammenti all'interno del vettore pCR 2.1 fornito dal T-A cloning kit (vedi paragrafo 6.9).

La reazione è stata allestita come consigliato nel datasheet:

PCR Buffer 10X	5 µl
dNTPs misti 10mM	1 µl
MgCl ₂ 50 Mm	1,5 µl
Primer F 10 µM	0,5 µl
Primer R 10 µM	0,5 µl
DNA templatato	≥ 1 µl
Platinum Taq DNA polimerasi	0,2 µl
H ₂ O distillata sterile	fino a volume (50 µl)

I prodotti di PCR sono poi stati verificati e quantificati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1%.

6.9 Clonaggio dei prodotti di PCR nel vettore pCR 2.1

A. Il vettore pCR 2.1

I prodotti di PCR amplificati con la Platinum Taq hanno delle estremità 3' protrudenti in cui sporge una Adenina. Queste due A sono state utilizzate per clonare i due frammeti di hCDKL5 nel vettore pCR 2.1 fornito nel T-A cloning kit (REF K2040-01). Tale vettore, come illustrato in figura 14, viene commercializzato linearizzato, e possiede due estremità 5' protrudenti in cui è presente una Timina; è lungo 3,9 kilobasi, possiede la resistenza agli

antibiotici Kanamicina e Ampicillina, ed è inoltre fornito della regione codificante la subunità α della β -galattosidasi: questa subunità complementa *in trans* con la subunità Ω dell'enzima, la cui sequenza codificante è localizzata nel DNA genomico di *E. Coli*. L'interruzione sul vettore pCR 2.1 in cui avviene l'inserimento dell'inserto è localizzata a cavallo della sequenza codificante per la subunità α : pertanto, quando l'inserto è assente e il vettore si richiude su se stesso in seguito alla reazione di ligation, la subunità α è prodotta normalmente, e insieme alla subunità Ω , catalizza la trasformazione del substrato X-gal (opportunamente piastrato sulle piastre in cui vengono poi cresciuti i batteri) in un prodotto colorato blu. Quando l'inserto si è correttamente inserito, è impedita la trascrizione della subunità α , l'enzima non è funzionante, e non avviene la trasformazione dell' X-gal: in questo caso la colonia apparirà bianca. Questo tipo di screening è chiamato Screening Bianco-Blu e consente di capire immediatamente quali colonie hanno correttamente internalizzato l'inserto nel vettore e in quali invece il vettore pCR 2.1 si è richiuso su se stesso.

B. Reazione di Ligation in pCR 2.1

Per clonare i due inserti prodotti per PCR all'interno del vettore pCR2.1 è stata allestita una reazione di ligation seguendo la seguente formula:

$$X \text{ ng di prodotto di PCR} = \frac{(Y \text{ bp del prodotto di PCR})(50 \text{ ng di vettore pCR2.1})}{3900 \text{ bp}}$$

dove 3900 bp è la dimensione del vettore pCR2.1. In questo modo si mettono inserto e vettore in rapporto 1:1. Tuttavia, per aumentare

l'efficienza del clonaggio, come consigliato nel datasheet, inserto e vettore sono stati mescolati in rapporto 3:1.

La reazione è stata allestita in 10 µl totali seguendo le indicazioni del datasheet nel seguente modo:

Inserto prodotto per PCR	X µl
Ligation Buffer 10X	1 µl
pCR 2.1 (vettore) 25 ng/ µl	2 µl
Acqua Elix sterile	A volume fino a 9 µl
T4 DNA ligasi (4.0 Weiss Units)	1 µl

La reazione è stata condotta O/N alla temperatura di 14 °C.

C. Trasformazione delle ligation in cellule competenti di *E. Coli* OneShot TOP 10

Le cellule One Shot TOP 10 sono cellule di *E. Coli* competenti, fornite con il T-A cloning kit. Consentono la trasformazione dei prodotti di ligation del vettore pCR 2.1. Esprimono la subunità Ω della β -galattosidasi, e non esprimono il repressore *Lac*: consentono quindi di eseguire lo screening banco-blu su piastre contenenti il substrato X-gal, senza la necessità di aggiungere l'induttore IPTG. Per eseguire la trasformazione, si procede a scongelare in ghiaccio le vials contenenti 50 µl di cellule competenti One Shot TOP 10. Una volta scongelate, a queste si aggiungono 2 µl della miscela di ligation, e si mescola dolcemente. Le vials vengono lasciate in ghiaccio per 30', durante i quali il DNA plasmidico aderisce al versante

esterno della membrana plasmatica. Si prosegue poi ad effettuare uno shock termico, in un bagnetto precedentemente riscaldato, a 42°C per 30'', durante i quali si creano dei pori nella membrana plasmatica, e il DNA penetra nella cellula. Le vials vengono immediatamente rimesse in ghiaccio per qualche minuto. A questo punto vengono aggiunti 250 µl di mezzo di crescita S.O.C. a temperatura ambiente, e si lasciano crescere i batteri per 1 h in un incubatore rotante. In questa fase i batteri che hanno acquisito il plasmide pCR 2.1 esprimono la resistenza all'ampicillina e alla kanamicina. Nel frattempo, si lasciano asciugare le piastre con il terreno selettivo contenenti l'antibiotico (kanamicina o ampicillina) per 30' a 37°C e successivamente si piastra il substrato X-gal su ciascuna piastra, 40 µl di una soluzione concentrata 40 mg/ml, avendo cura di tenere, da questo momento in poi, le piastre lontane della luce. Trascorsa l'ora di prescelta, si piastrano i batteri, in due concentrazioni, 25 e 100 µl, e si lasciano crescere O/N a 37°C.

D. Analisi dei cloni

Una volta trasformati i batteri con la miscela di ligation e ottenute le piastre, si è proceduto all'analisi di un certo numero di colonie per individuare i cloni in cui l'inserito si è inserito correttamente all'interno del plasmide pCR 2.1. Per fare questo, sono state selezionate alcune colonie bianche (in numero variabile da 4 a 8), sono state isolate con un'opportuna ansa sterile e sono state reinoculate in 5 ml di terreno liquido LB contenente l'anticorpo opportuno (ampicillina o kanamicina). Ciascuna crescita è stata tenuta O/N a 37°C su un incubatore rotante. Il giorno successivo, si è proceduto all'estrazione del DNA plasmidico con il kit

commerciale QIAprep Spin Miniprep (vedi paragrafo Materiali e Metodi 6.3). Il DNA plasmidico è stato digerito con enzimi di restrizione per verificare la presenza dell'inserto e la sua dimensione. I prodotti di digestione sono stati corsi su un gel di agarosio all'1% unitamente ad un marcatore di pesi molecolari. I cloni risultati positivi a questa prima verifica sono stati selezionati e inviati a sequenziare presso una ditta esterna. I cloni la cui sequenza è risultata corretta sono stati utilizzati per allestire una nuova crescita in 5 ml, che è servita per conservare un'aliquota di batteri positivi in una soluzione contenente il 20% di glicerolo a -80°C.

6.10 Clonaggio di hCDKL5 in pEGFPN1

A. Digestione con enzimi di restrizione

Una volta concluso il clonaggio dei due inserti prodotti per PCR nel vettore pCR 2.1, entrambi i frammenti sono stati digeriti con enzimi di restrizione per procedere al clonaggio del vettore finale pEGFPN1. Tali enzimi sono delle endonucleasi in grado di riconoscere in modo specifico alcune sequenze di 4, 6 o 8 paia di basi sul DNA e di operare un taglio a doppio filamento in corrispondenza di tale sequenza. Gli enzimi utilizzati durante le fasi del clonaggio sono XhoI (sito riconosciuto 5'-G TCGAG-3'), EcoRI (sito riconosciuto 5'-G AATTC-3') e BamHI (sito riconosciuto 5'-G GATTC-3'). La reazione di digestione è stata allestita utilizzando l'enzima di restrizione in relazione alla quantità di DNA da digerire: è sufficiente 1 U di enzima per digerire 1 µg di DNA. Il buffer, appropriato all'enzima che si desidera utilizzare, contiene sali e deve essere utilizzato

alla concentrazione finale di 1X. Alcuni enzimi richiedono la BSA, la quale deve essere aggiunta alla soluzione alla concentrazione finale di 1X. La miscela di reazione viene portata a volume con H₂O Elix. Tutte le digestioni sono state eseguite per 2 h a 37°C.

Le digestioni con gli enzimi di restrizione BamHI, EcoRI e XhoI sono state utilizzate per preparare i due inserti e il vettore alla successiva reazione di ligation, e inoltre per verificare i prodotti del clonaggio. Nello specifico, il primo frammento, che va dalla posizione 1 alla posizione 1572 di hCDKL5 (code dei primer escluse) è stato digerito con XhoI e EcoRI in una doppia digestione in 25 µl; la stessa cosa è stata fatta per il vettore pEGFPN1. Parallelamente, il secondo frammento, contenente i residui 1573-3087 di hCDKL5, è stato digerito con EcoRI e BamHI.

Al fine di ottenere una quantità sufficiente sia di vettore pEGFPN1 che dei due inserti, sono stati digeriti 0,5-1 µg degli inserti e 3 µg di vettore.

	Reazione in 15 µl	Reazione in 25 µl
Enzima di restrizione	1 µl	1 µl ciascuno
DNA	X µl	X µl
Buffer 10 X	1,5 µl	2,5 µl
Bsa 10 X (ove richiesta)	1,5 µl	2,5 µl
H ₂ O Elix	fino a volume	fino a volume

NEBuffer 3 1X (BamHI)

50 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

10 mM MgCl₂

1 mM Dithiothreitol

pH 7.9 a 25°C

NEBuffer EcoRI 1X

100 mM Tris-HCl

50 mM NaCl

10 mM MgCl₂

0.025 % Triton X-100

pH 7.5 a 25°C

1X NEBuffer 4:

20 mM Tris-acetate

50 mM potassium acetate

10 mM Magnesium Acetate

1 mM Dithiothreitol

pH 7.9 a 25°C

B. Fosfatasi alcalina (CIP)

La miscela di digestione contenente il vettore pEGFPN1 è stata poi sottoposta a reazione con l'enzima CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, New England Biolabs, REF M0290L). Questo enzima ha la capacità di rimuovere i gruppi fosfato al 5' delle estremità del vettore linearizzato. Questa procedura abbassa lievemente la resa del clonaggio ma ne aumenta la specificità, impedendo che il vettore si richiuda su se stesso senza accettare l'inserito. La rimozione dei fosfati al 5' rende quasi impossibile al vettore richiudersi su se stesso in assenza dell'inserito, che fornisce i gruppi fosfato al 5'. La reazione è stata allestita come illustrato

sotto, ed è stata condotta per 30' a 37°C alla conclusione della digestione con gli enzimi di restrizione:

Miscela di digestione con enzimi di restrizione

2 µl CIP

2 µl NEBuffer 3 10X

16 µl H₂O Elix

C. Taglio delle bande da gel e purificazione con kit commercial QIAGEN MinElute Gel Extraction Kit

I prodotti di digestione sono stati corsi su un gel di agarosio all'1% unitamente ad un marcatore di pesi molecolari per circa un'ora a 100V. Una volta separate a sufficienza, le bande degli inserti e del vettore pEGFPN1 linearizzato sono state tagliate dal gel e purificate con il kit QIAGEN MinElute Gel Extraction kit. Seguendo il protocollo, le bande, una volta tagliate e poste in un tubo da 2 ml, sono state pesate. Alle bande così tagliate sono stati aggiunti 3 volumi di Buffer QG (considerando approssimativamente la corrispondenza tra 100 mg di gel e 100 µl di buffer). I tubi contenenti il gel e il Buffer QC sono stati poi posti a 50°C per circa 10' per sciogliere l'agarosio. Una volta disciolto il gel, alla soluzione è stato aggiunto 1 volume corrispondente al peso del gel iniziale di isopropanolo, per precipitare il DNA. La miscela è stata trasferita nelle apposite colonnine fornite insieme al kit, e centrifugata alla massima velocità per 1'. Il *flowthrough* è stato scartato, e alle colonnine sono stati aggiunti 0,5 µl di Buffer QG. Le colonnine sono state nuovamente centrifugate per 1'. Il *flowthrough* è stato nuovamente scartato, e sono stati

aggiunti 0,75 µl di Buffer PE. Dopo 1' di centrifuga, il *flowtought* è stato scartato ed è stato effettuato un altro passaggio in centrifuga per rimuovere tutti i residui di Buffer PE. Infine, per eluire il DNA le colonnine sono state poste in nuovi tubi da 1,5 ml e sono stati inseriti nella colonna 20 µl di Buffer EB. Le colonnine sono state centrifugate per 1'. Il DNA così estratto e purificato è stato sottoposto a corsa elettroforetica per verificarne lo stato e la quantità per l'allestimento della successiva reazione di ligation.

D. Ligation in pEGFPN1

Una volta digeriti e purificati il vettore e i due frammenti costituenti il cDNA di hCDKL5, è stata allestita una prima reazione di ligation tra il vettore pEGFPN1 digerito con gli enzimi XhoI e EcoRI e l'inserto contenente la prima parte del cDNA di hCDKL5 (residui 1-1572) digerito allo stesso modo. Tali reazioni sono state allestite facendo in modo di mettere l'inserto e il vettore in un rapporto di 3:1. La miscela di reazione è stata allestita utilizzando l'enzima T4 DNA ligasi della New Englands Biolabs e il Buffer appropriato (REF M0202L). La mix utilizzata è la seguente:

Ligation

X µl di vettore (circa 50 ng)
X µl inserto (rapporto 3:1
inserto:vettore)
1 µl T4 DNA ligase
1,5 µl Buffer
A volume con H₂O Elix

C -

X µl di vettore (circa 50 ng)

-
1 µl T4 DNA ligase
1,5 µl Buffer
A volume con H₂O Elix

La reazione è stata portata avanti O/N a 16°C.

Buffer di storage della T4 DNA ligase

10 mM Tris-HCl

50 mM KCl

1 mM Dithiothreitol

0.1 mM EDTA

50% Glycerol

pH 7.4 a 25°C

Buffer di reazione T4 DNA ligase 1X

50 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

1 mM ATP

10 mM Dithiothreitol

pH 7.5 a 25°C.

E. Trasformazione e selezione dei cloni

I prodotti di ligation sono stati trasformati come illustrato nel paragrafo 6.2. In questa fase, sono stati trasformati 7,5 µl della miscela di ligation. I batteri sono stati piastrati in terreno solido contenente kanamicina (50 µg/ml), ed è stata fatta la selezione dei cloni positivi attraverso reinoculazione in terreno liquido LB contenente kanamicina (50 µg/ml), estrazione del DNA e digestione di controllo con enzimi di restrizione. I

cloni positivi sono stati selezionati e sono state preparate delle cryovials contenenti la crescita batterica in glicerolo al 20% (tenute a -80°C).

F. Clonaggio del secondo inserto in pEGFPN1-hCDKL5 (1-1572)

Una volta completata la prima fase del clonaggio, il vettore pEGFPN1 contenente la prima parte del cDNA di hCDKL5 (residui 1-1572) è stato digerito con gli enzimi EcoRI e BamHI, e la stessa digestione è stata effettuata per estrarre il secondo inserto (residui 1573-3087) dal pCR 2.1. Esattamente come per il clonaggio del primo frammento, è stata allestita la reazione di ligation, il prodotto è stato trasformato in cellule di *E. Coli* competenti, le colonie sono state reinoculate in 5ml di terreno liquido LB contenente kanamicina (50 µg/ml), è stato estratto il DNA plasmidico e sono stati selezionati i cloni positivi. Per individuare i cloni che hanno correttamente inserito anche il secondo frammento, è stata effettuata una digestione con gli enzimi di restrizione XhoI e BamHI, per excidere l'intero inserto (circa 3087 bp).

RISULTATI

1. Analisi della localizzazione di CDKL5 endogena in fibroblasti murini

Prima di procedere ad una caratterizzazione in cellule viventi della dinamica spazio temporale di CDKL5 è stata analizzata la sua localizzazione subcellulare con tecniche statiche di immunocitochimica e di imaging dinamico. Dalla letteratura è noto che la proteina è presente sia nel compartimento nucleare che in quello citoplasmatico (Bertani, Rusconi et al. 2006). Per caratterizzare in maniera specifica la localizzazione subcellulare della proteina endogena è stata eseguita un'immunocitochimica su fibroblasti murini in coltura (NIH 3T3). Le cellule sono state tenute in coltura a 37°C in terreno DMEM-F12 con New Born Calf Serum, piastrate su appositi vetrini, fissate e incubate con l'anticorpo primario policlonale di coniglio anti-hCDKL5. I preparati fissati e incubati con l'anticorpo primario sono stati successivamente incubati con un anticorpo secondario anti-coniglio coniugato al fluoroforo Alexa 543, che assorbe nelle lunghezze d'onda del verde ed emette nel rosso. Non si osserva marcatura di fondo nell'esperimento di controllo in cui le cellule sono state fissate e incubate in assenza dell'anticorpo primario (dati non illustrati).

L'esperimento di immunocitochimica ha confermato quanto riportato in letteratura: si osserva marcatura diffusa sia a livello del nucleo che del citoplasma, con degli accumuli particolarmente fluorescenti a livello di tutto il compartimento citoplasmatico (vedi figura 17). Emerge inoltre che la distribuzione della proteina non è uguale in tutte le cellule (vedi Pannello A Figura 17). Si osserva come in alcune cellule la distribuzione sia prevalentemente citoplasmatica, con un nucleo visibilmente meno fluorescente, mentre in altre il nucleo appare più fluorescente del

citoplasma; una terza popolazione di cellule mostra una distribuzione uniforme della proteina tra i due compartimenti.

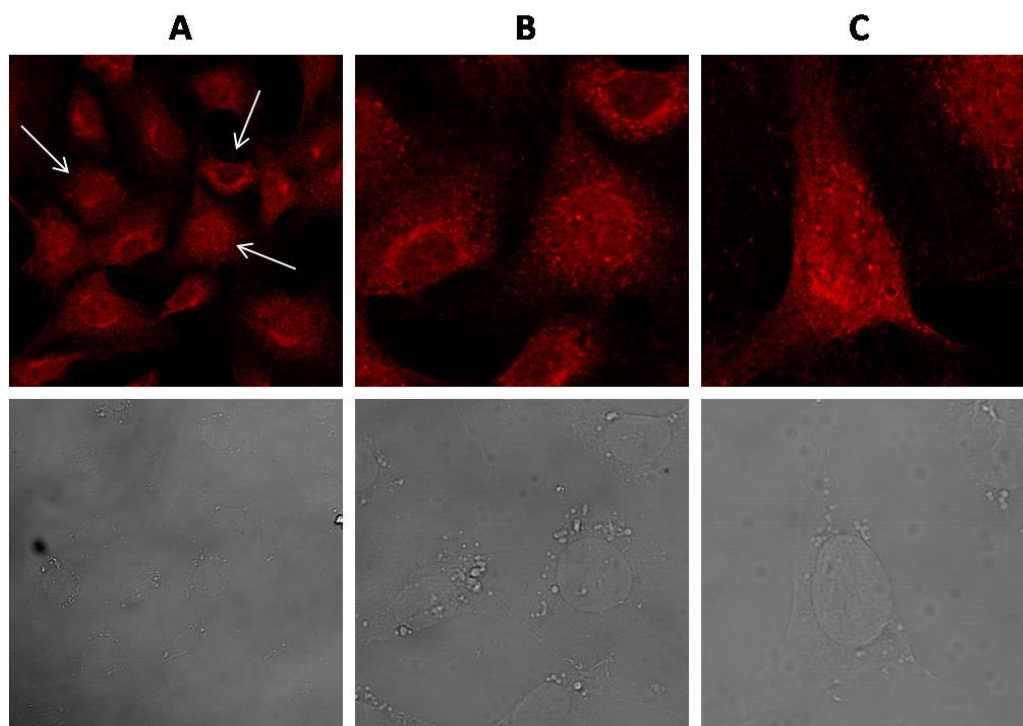


Figura 17. Immunocitochimica di CDKL5 in cellule NIH 3T3. In rosso si osserva la marcatura per hCDKL5. Pannello A) Panoramica di un insieme di cellule; le frecce bianche indicano i 3 sottotipi cellulari identificati: sulla sinistra è indicata una cellula con una distribuzione omogenea di proteina tra nucleo e citoplasma; in alto si osserva una cellula con il nucleo marcatamente meno fluorescente del citoplasma; in basso una cellula con il nucleo più fluorescente del citoplasma. Pannello B) Si osserva la stessa situazione del pannello precedente ad un ingrandimento maggiore. Pannello C) Particolare di una cellula. Si possono apprezzare le puntature fluorescenti a livello del citoplasma.

Una caratteristica peculiare di CDKL5 riguarda la sua distribuzione citoplasmatica: si osservano infatti dei piccoli accumuli vescicolati intensamente fluorescenti a livello di tutto il compartimento citoplasmatico (vedi pannello C Figura 17).

In esperimenti successivi si è tentato di comprendere la natura di questi piccoli addensamenti (vedi paragrafo 3.4).

2. Produzione del vettore per l'espressione della proteina di fusione hCDKL5₁₁₅-GFP in pEGFPN1

Gli esperimenti di immunocitochimica forniscono preziose informazioni sulla localizzazione e distribuzione della proteina endogena, ma hanno lo svantaggio di dover essere eseguiti su cellule fissate, e danno pertanto informazioni di tipo statico. Per indagare la localizzazione di hCDKL5 in cellule viventi ed osservarne i cambiamenti nel tempo, è stato prodotto un costrutto che esprime la proteina di fusione hCDKL5₁₁₅-GFP all'interno del vettore pEGFPN1. La scelta di allestire il clonaggio in modo da fondere la GFP all'estremità carbossi-terminale della proteina è stata dettata da precedenti osservazioni che indicano che tale strategia porta a una localizzazione maggiormente fedele a quella della proteina endogena.

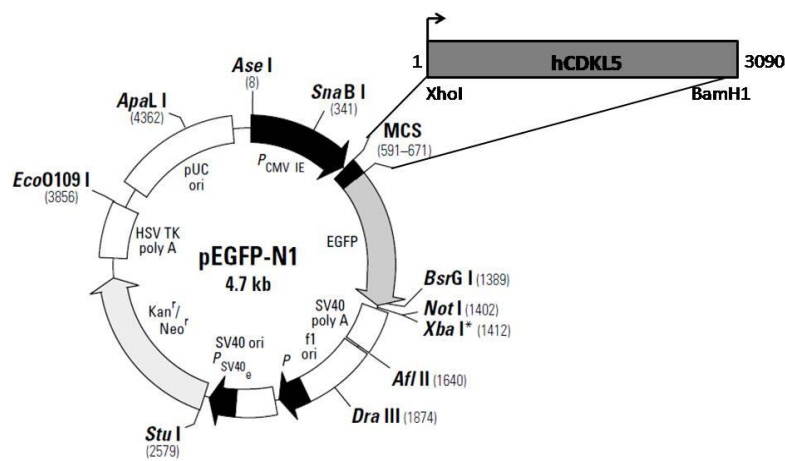


Figura 18. Rappresentazione schematica del costrutto in cui la proteina hCDKL5₁₁₅ è clonata all'interno del vettore pEGFPN1, utilizzando i siti di restrizione XhoI e BamHI.

Il cDNA di hCDKL5₁₁₅ è stato amplificato per PCR a partire dal vettore hCDKL5-pFC8A con primer dotati di code contenenti siti per enzimi di restrizione; il cDNA è stato dapprima clonato all'interno del vettore pCR

2.1 del *T-A cloning kit* della Invitrogen e poi subclonato nel vettore finale Clontech pEGFPN1. Il risultato del clonaggio nel vettore pCR 2.1 è stato verificato tramite sequenziamento. Date le dimensioni del cDNA (3090 bp), il clonaggio è stato effettuato in due parti, amplificando dapprima il frammento che va dal sito XhoI a EcoRI nel vettore pEGFPN1, e successivamente clonando in questo costrutto il secondo frammento, che va dal sito EcoRI al sito BamHI (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 6).

3. Analisi della localizzazione delle proteine di fusione GFP-hCDKL5 wild type

3.1. Localizzazione di GFP-hCDKL5₁₁₅

Per accertarsi che il costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅ avesse una localizzazione fedele a quella della proteina endogena, come prima cosa la proteina è stata fatta esprimere in cellule viventi. La linea cellulare utilizzata per questa esperimento preliminare è quella delle SHSY-5Y, una linea di neuroblastoma umano di riferimento per studiare proteine espresse nel sistema nervoso. La localizzazione della proteina in cellule viventi SHSY-5Y ricalca quella della proteina endogena indagata per immunocitochimica (figura 19).

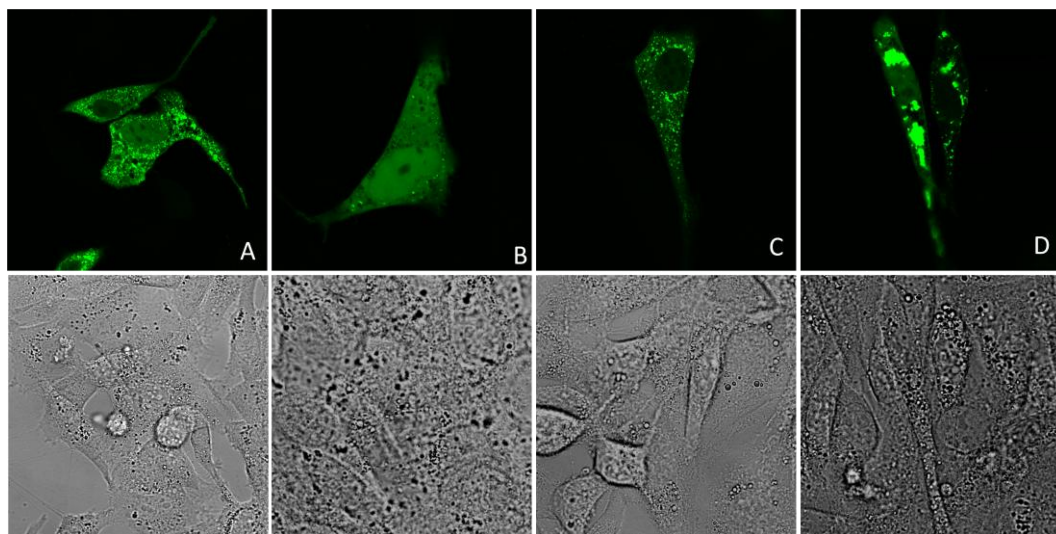


Figura 19. Localizzazione del costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅ in cellule SHSY-5Y. In A è possibile osservare una cellula (in basso) con una distribuzione di fluorescenza omogenea tra nucleo e citoplasma e una (in alto) con il nucleo meno fluorescente. In B una cellula con il nucleo più fluorescente del citoplasma. In C la cellula ha il citoplasma più fluorescente del nucleo. In D si osservano cellule con vistosi agglomerati fluorescenti a livello del citoplasma.

Si osservano situazioni differenti per quanto riguarda la localizzazione subcellulare della proteina fluorescente: sono presenti cellule con un nucleo più fluorescente del citoplasma (immagine B figura 19), cellule con

il nucleo meno fluorescente (immagine C figura 19), e cellule omogenee (cellula in basso immagine A figura 19). Ad eccezione di alcune cellule (immagine B figura 19), tutte presentano la distribuzione punteggiata caratteristica a livello del citoplasma osservata anche nel caso della proteina endogena. Talvolta si osservano cellule in cui sono presenti agglomerati molto fluorescenti di dimensioni più grandi rispetto a quelli osservati in tutte le cellule (immagine D figura 19). La localizzazione del costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅ osservata nelle cellule SHSY-5Y è stata analizzata e validata anche in cellule gliali ottenute da colture primarie di corteccia di topi P0-P1, ed è risultata sovrapponibile a quella osservata nelle SH-SY (dati non mostrati).

La localizzazione della proteina GFP-hCDKL5₁₁₅ è stata quindi analizzata in cellule NIH 3T3 (figura 20, immagini E, F, G, H). Da tale analisi emerge che il costrutto di fusione espresso nelle cellule NIH 3T3 ricalca in modo preciso la localizzazione della proteina endogena precedentemente osservata per immunocitochimica, e di quella osservata nella linea neuronale SHSY-5Y e nelle cellule gliali. La proteina è presente sia nel nucleo che nel citoplasma, con una particolare marcatura punteggiata nel compartimento citoplasmatico. Sono inoltre presenti 3 distinte popolazioni di cellule: quelle con un rapporto di fluorescenza nucleo/citoplasma pressoché pari a uno, quelle in cui il nucleo è più fluorescente (rapporto di fluorescenza >1) e infine quelle in cui è il compartimento citoplasmatico ad avere una fluorescenza maggiore (rapporto di fluorescenza <1). Per questo motivo, per tutti gli esperimenti si è scelto di proseguire l'analisi nella linea cellulare NIH 3T3 che mantiene una localizzazione fedele della proteina hCDKL5, ma è più semplice ed economica da manipolare.

3.2 Localizzazione di hCDKL5₁₁₅-GFP

La localizzazione del costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅ è stata poi paragonata con quella del costrutto da noi prodotto, in cui il cDNA di hCDKL5₁₁₅ è clonato nel vettore Clontech pEGFPN1. Anche in questo caso la localizzazione si mantiene fedele a quella della proteina endogena osservata per immunocitochimica; sono presenti cellule di tutte e tre le popolazioni sopracitate, omogenee, con il nucleo più fluorescente del citoplasma e viceversa (figura 20). Anche in questo caso si osserva la caratteristica distribuzione punteggiata nel citoplasma. In conclusione, i due costrutti possono considerarsi sovrapponibili.

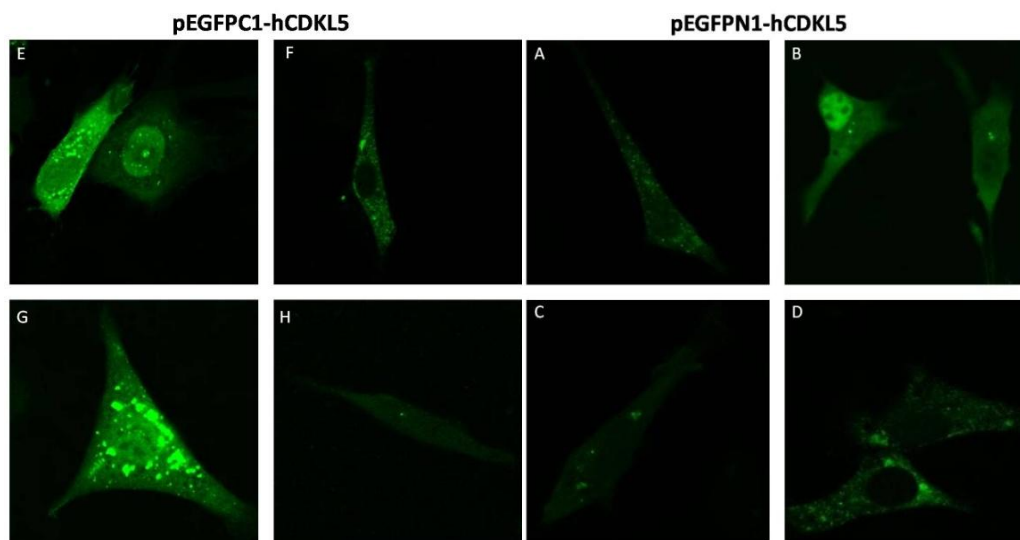


Figura 20. Pannello sinistro: cellule NIH-3T3 trasfettate con il costrutto pEGFPN1-hCDKL5₁₁₅. Si osservano esempi delle 3 situazioni cellulari (immagine B cellula sulla destra, immagine C, cellule omogenee. Immagine B cellula a sinistra, cellule con nucleo più fluorescente. Immagini A e D, cellule con citoplasma più fluorescente. Si osservano i piccoli agglomerati citoplasmatici, di modeste dimensioni (immagini A e D). Pannello destro: cellule NIH 3T3 trasfettate con il costrutto pEGFPC1-hCDKL5₁₁₅. Anche in questo caso si osservano le 3 situazioni distinte. Immagine H, cellula omogenea. Immagine E cellula a destra, cellula con nucleo più fluorescente. Immagine F, cellula con citoplasma più fluorescente. Gli agglomerati citoplasmatici sono di dimensioni maggiori e hanno un livello di fluorescenza più marcata (immagini E, G).

Il costrutto hCDKL5₁₁₅-GFP pone le cellule trasfettate in una condizione più fisiologica; in questo caso infatti non sono stati riscontrati i grandi

ammassi fluorescenti all'interno del citoplasma che si osservano talvolta quando si analizza la localizzazione del costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅ (immagine G figura 20). Successivamente è stata analizzata la localizzazione degli altri costrutti già presenti in laboratorio. Si tratta di costrutti in cui la proteina hCDKL5 è clonata all'interno del vettore pEGFPC1. I costrutti A e B rappresentati in figura 21 sono quelli descritti precedentemente. Il costrutto C contiene un'isoforma più breve di hCDKL5, da 107 kDa, descritta recentemente in letteratura da Williamson e colleghi (Williamson, Giudici *et al.* 2011). I costrutti D ed E contengono rispettivamente le mutazioni puntiformi C152F ed R175S. I costrutti F e G sono due forme troncate della proteina, la Δ C525 (mutante di sintesi) mancante di tutto il dominio carbossi terminale e la mutazione patologica Δ C781.

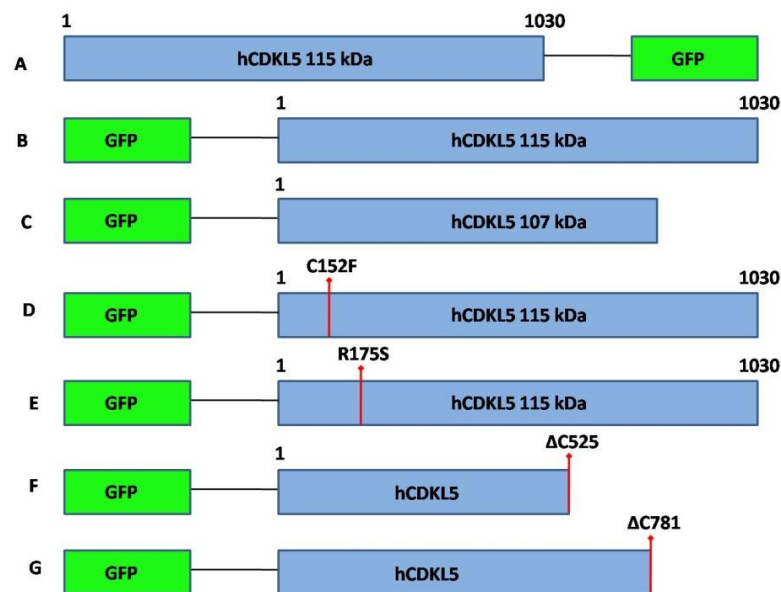


Figura 21. Rappresentazione schematica dei costrutti hCDKL5 fusi alla GFP descritti. A) Costrutto da me realizzato in cui hCDKL5₁₁₅ è inserito nel vettore pEGFPN1; B) Costrutto in cui la hCDKL5₁₁₅ è inserita nel vettore pEGFPC1; C) Costrutto in cui l'isoforma alternativa che termina con l'introne 18 è clonata nel vettore pEGFPC1; D ed E) costrutti in cui hCDKL5 porta le mutazioni patologiche puntiformi C152F e R175S; F e G) Costrutti in cui le forme troncate Δ C 525 e Δ C 781 sono clonate nel vettore pEGFPC1. I costrutti da B a G sono stati forniti per gentile concessione da Landsberger e colleghi.

3.3 Localizzazione della proteina GFP-hCDKL5₁₀₇

Recentemente è stata descritta una isoforma alternativa di hCDKL5, più corta, che termina con l'introne 18, con un peso molecolare di 107kDa (Williamson, Giudici et al. 2011). Seguendo le stesse procedure sperimentali sopra descritte, è stata analizzata la localizzazione subcellulare della proteina GFP-hCDKL5₁₀₇.

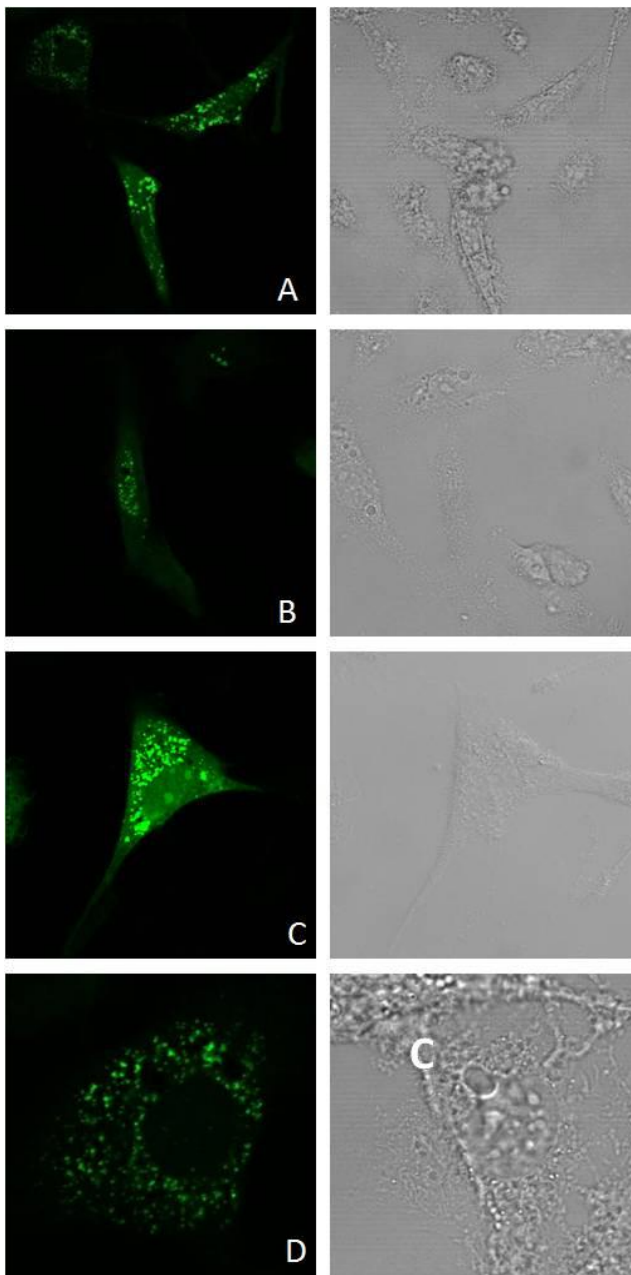


Figura 22. Cellule NIH 3T3 che esemplificano la localizzazione delle proteina GFP-hCDKL5₁₀₇. In C è possibile osservare una cellula con una distribuzione di fluorescenza omogenea tra nucleo e citoplasma; in D si osserva una cellula con il citoplasma vistosamente più fluorescente del nucleo. In B invece è presente una cellula con il nucleo più fluorescente rispetto al citoplasma. In A ed E si osserva a livello del citoplasma la caratteristica distribuzione punteggiata della fluorescenza. In B il nucleo presenta una distribuzione particolare della fluorescenza, che si accumula in piccole vescicole.

Anche in questo caso c'è una cospicua variabilità nella localizzazione subcellulare della proteina, si osservano cellule con una fluorescenza pressoché omogenea tra nucleo e citoplasma (rapporto di fluorescenza ≈ 1) (immagine C in figura 22) accanto ad altre in cui la proteina è esclusa dal compartimento nucleare (rapporto di fluorescenza $\ll 1$) (immagine D in figura 22), ad altre ancora in cui il nucleo è più fluorescente del citoplasma (rapporto di fluorescenza $\gg 1$) (immagine B in figura 22). Sono visibili i piccoli aggregati citoplasmatici intensamente fluorescenti (vedi immagine D figura 22). Sussiste però una differenza significativa rispetto all'isoforma da 115 kDa: in numerose cellule si osserva una caratteristica localizzazione punteggiata a livello del nucleo, che potrebbe essere compatibile con la localizzazione nelle *nuclear speckles* descritta da Ricciardi e colleghi (immagine B figura 22). (Ricciardi, Kilstrup-Nielsen et al. 2009).

3.4 Piccole vescicole citoplasmatiche: colorazione con LysoTracker

Entrambe le proteine di fusione di hCDKL5 wild type (GFP-hCDKL5₁₁₅ e hCDKL5₁₁₅-GFP) così come la forma alternativa da 107kDa mostrano una caratteristica distribuzione punteggiata a livello del citoplasma, che si fa più intensa e con vescicole di dimensioni maggiori nel costrutto in pEGFPC1. Per tentare di comprendere la natura di questi microaggregati, cellule NIH 3T3 sono state trasfettate con i due costrutti e sono state poi marcate con un tracciante specifico per i lisosomi, il LysoTracker® Red DND-99, con elevata specificità per gli organuli a pH acido (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 4.3). L'analisi è stata eseguita ad un microscopio confocale utilizzando il laser a 488 nm per visualizzare la GFP e il laser 543 nm per rilevare la fluorescenza del LysoTracker.

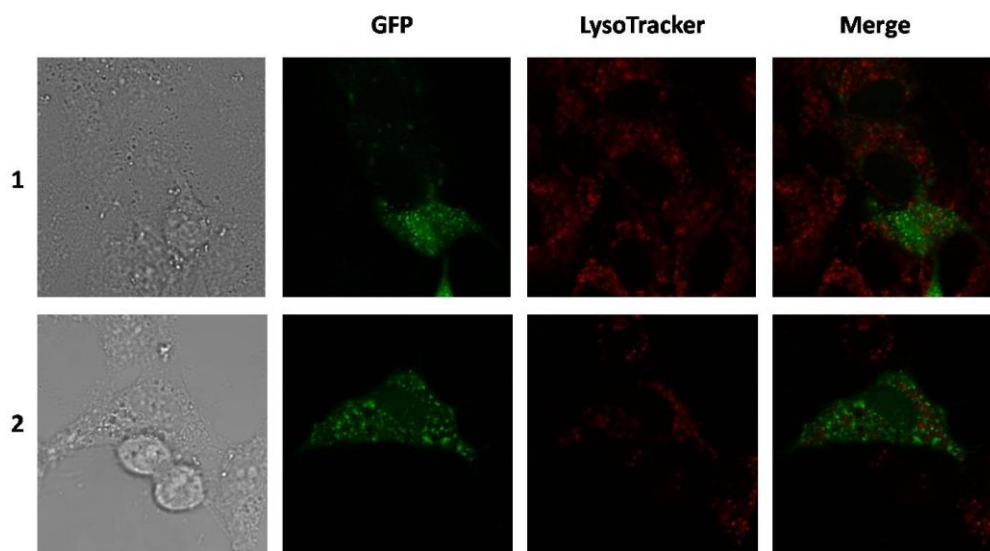


Figura 23. In verde si osserva la localizzazione di hCDKL5; in rosso il LysoTracker; il Merge mostra che non vi è colocalizzazione dei due segnali. Nel pannello superiore (1) sono mostrate le cellule trasfettate con pEGFPC1-hCDKL5₁₁₅, nel pannello inferiore (2) con pEGFPN1-hCDKL5₁₁₅.

L'ipotesi di partenza non è stata confermata, poiché non si osserva sovrapposizione del segnale: il reticolato vescicolare osservato non

corrisponde ai lisosomi e quindi CDKL5 non localizza a livello di tali organuli. Sono in programma esperimenti ulteriori per chiarire la natura di tali vescicole, attraverso l'impiego di marcatori mitocondriali e di reticolo endoplasmatico.

3.5 Analisi della localizzazione dei mutanti puntiformi patologici C152F e R175S

La caratterizzazione della localizzazione dei costrutti GFP-hCDKL5 è proseguita analizzando i mutanti puntiformi C152F e R175S, entrambi fusi alla GFP nel vettore pEGFPC1. I costrutti sono stati trasfettati in cellule NIH 3T3 e osservati 24 ore dopo la trasfezione.

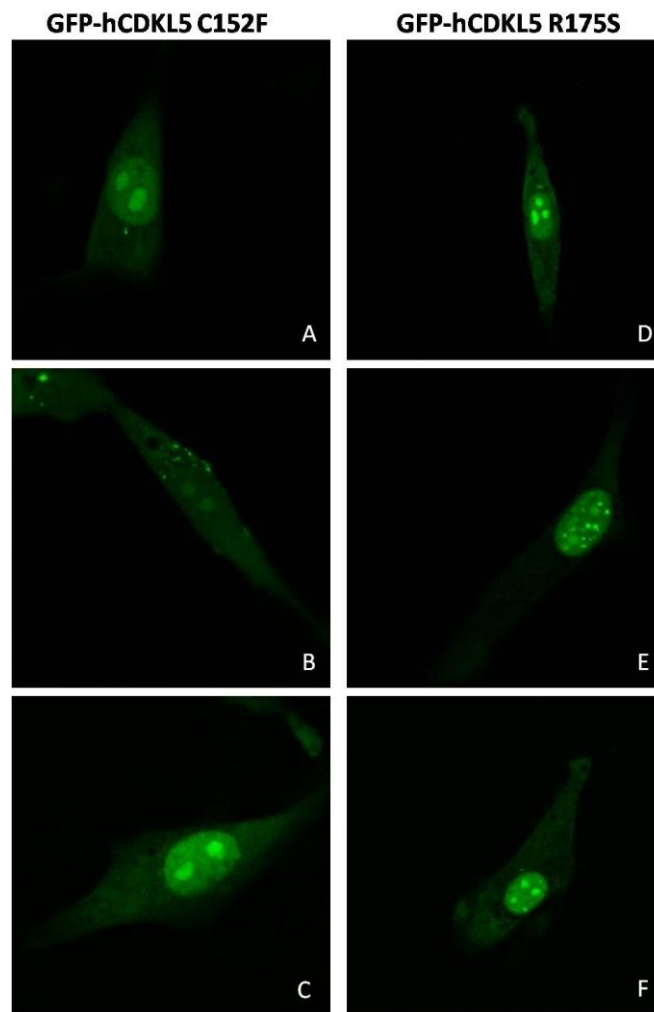


Figura 24. Localizzazione di GFP-hCDKL5 C152F (immagini A, B e C) e di GFP-hCDKL5 R175S (immagini D, E e F). In tutte le immagini si osserva l'intensa marcatura dei nucleoli. Si può notare che nella cellula in B il nucleo è fluorescente quanto il citoplasma. In E all'interno del nucleo sono visibili delle punteggiature fluorescenti.

I due mutanti puntiformi mostrano un profilo simile: la proteina è localizzata prevalentemente nel nucleo, con una fluorescenza residua

anche nel citoplasma. Dai dati raccolti, la proteina con le mutazioni in questione non si aggrega a formare il reticolato vescicolare che si osserva nelle forme wild type (sia la 115 kDa che la 107 kDa). Inoltre, in entrambi i mutanti, si osserva una marcata fluorescenza a livello dei nucleoli, visibilmente più fluorescenti del resto del nucleoplasma. Infine, nella proteina con la mutazione puntiforme R175S, in alcune cellule si osserva una caratteristica distribuzione punteggiata all'interno del nucleo, che potrebbe essere assimilabile alle *nuclear speckles* osservate da Ricciardi e colleghi (Ricciardi, Kilstrup-Nielsen et al. 2009). Diversamente dalle cellule esprimenti le proteine wild type, che presentano tre classi distinte di localizzazione cellulare (figure 17, 20, 22), nel caso dei mutanti C152F e R175S la localizzazione subcellulare è ascrivibile ad un'unica classe di cellule, il cui rapporto di fluorescenza nucleo/citoplasma è di $2.64 \pm 0,7$ (n=6) per il mutante C152F e di $3.83 \pm 0,8$ (n=6) per il mutante R175S. Tale differenza è apprezzabile qualitativamente anche dalle immagini in figura 24.

3.6 Analisi della localizzazione dei mutanti troncati Δ C525 e Δ C781

Entrambi i mutanti (Δ C525 e Δ C781) mostrano una analoga localizzazione subcellulare (figura 25): il nucleo è visibilmente più fluorescente del citoplasma (rapporto di fluorescenza nucleo/citoplasma $5.6 \pm 1,3$, n=6 per il Δ C525 e $3.64 \pm 1,1$, n=5 per il Δ C781) ; i nucleoli, salvo alcune eccezioni (immagine C figura 25) non sono più fluorescenti del resto del nucleoplasma, come accade invece per i mutanti puntiformi C152F e R175S. A livello del citoplasma non si osserva, in nessun caso, ne per il mutante Δ C525 ne per il Δ C781, la caratteristica distribuzione punteggiata osservata nelle isoforme wild type hCDKL5₁₁₅ e hCDKL5₁₀₇.

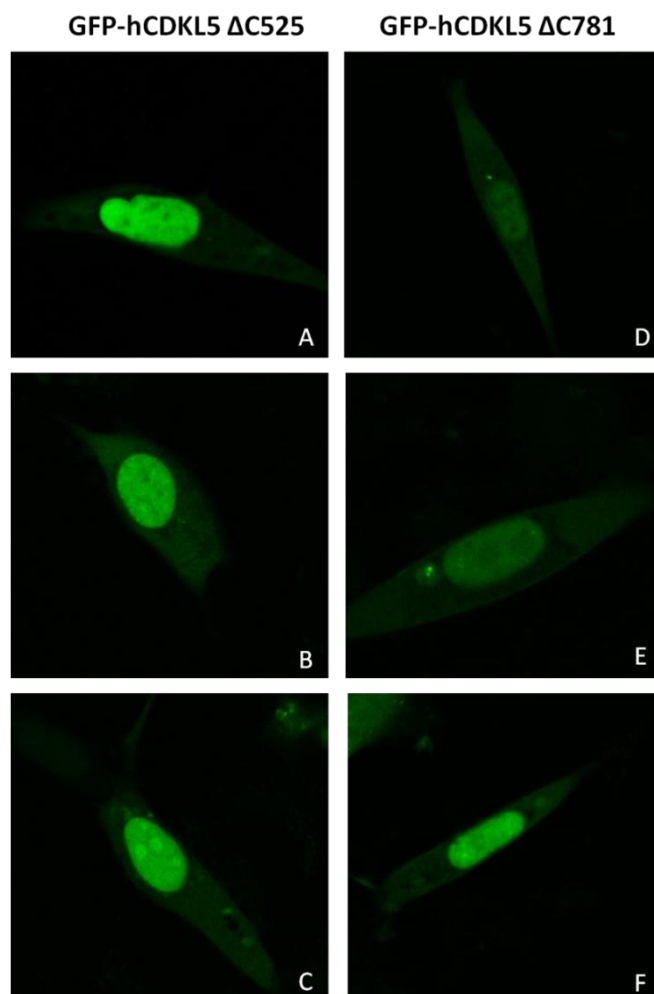


Figura 25. Localizzazione dei costrutti GFP-hCDKL5 Δ C525 (immagini A, B e C) e GFP-hCDKL5 Δ C781 (immagini D, E ed F).

3.7 Conclusioni sulla localizzazione delle proteine di fusione GFP-hCDKL5

È stata eseguita l'analisi statistica per confrontare i rapporti di fluorescenza nucleo/citoplasma dei vari costrutti di fusione. Per quanto concerne la proteina wild type da 115 kDa, sono state dapprima confrontate le due proteine di fusione recanti la GFP all'estremità carbossi terminale di hCDKL5 (hCDKL5₁₁₅-GFP) e all'estremità ammino terminale (GFP-hCDKL5₁₁₅). In entrambi i casi, i rapporti sono stati calcolati per

cellule appartenenti alla sottopopolazione con una distribuzione di fluorescenza omogenea tra i due compartimenti. Per la proteina GFP-hCDKL5₁₁₅, il rapporto di fluorescenza medio tra nucleo e citoplasma calcolato è risultato essere $0,99 \pm 0,21$ (n=7); per la proteina hCDKL5₁₁₅-GFP il rapporto è pari a $0,98 \pm 0,18$ (n=7). Il confronto statistico è stato effettuato mediante test t di Student per dati indipendenti, e le due situazioni non sono risultate significativamente differenti ($p > 0,05$). I due costrutti possono dunque dirsi sovrapponibili, pertanto le due serie di dati sono state unite, ed è stato calcolato un nuovo rapporto medio, che è risultato essere $0,99 \pm 0,19$ (n=14). Quest'ultimo dato è stato utilizzato come riferimento nel paragone con i rapporti di fluorescenza nucleo/citoplasma calcolati per il costrutto GFP-hCDKL5₁₀₇ e per i mutanti $\Delta C525$, $\Delta C781$, C152F e R175S.

Per la proteina da 107 kDa il rapporto medio di fluorescenza tra nucleo e citoplasma risulta essere di $1,15 \pm 0,35$ (n=6). Tale valore è stato paragonato con il valore di riferimento per la proteina wild type calcolato sopra ($0,99 \pm 0,19$) e l'analisi statistica mediante test t di Student per dati indipendenti ha dimostrato che i due valori non differiscono significativamente ($p > 0,05$). Le due proteine mostrano quindi una distribuzione di fluorescenza sovrapponibile.

Il rapporto di fluorescenza medio tra nucleo e citoplasma nel caso del mutante $\Delta C525$ è pari a $5,6 \pm 1,3$ (n=6), mentre per il mutante $\Delta C781$ risulta pari a $3,64 \pm 1,1$ (n=5). I due valori sono stati confrontati tra loro mediante test t di Student, e sono risultati essere non significativamente diversi ($p > 0,05$), mentre risultano essere entrambi significativamente diversi quando paragonati singolarmente con il valore di riferimento della proteina wild type da 115 kDa (valori di riferimento $0,99 \pm 0,19$) ($p < 0,05$).

I rapporti medi di fluorescenza tra nucleo e citoplasma per i mutanti C152F e R175S risultano essere rispettivamente $2.64 \pm 0,7$ (n=6) di $3.83 \pm 0,8$ (n=6). Quando confrontati tra loro non si rileva una differenza significativa ($p>0,05$), mentre entrambi risultano significativamente differenti dalla situazione della proteina wild type (valori di riferimento $0,99 \pm 0,19$) ($p<0,05$).

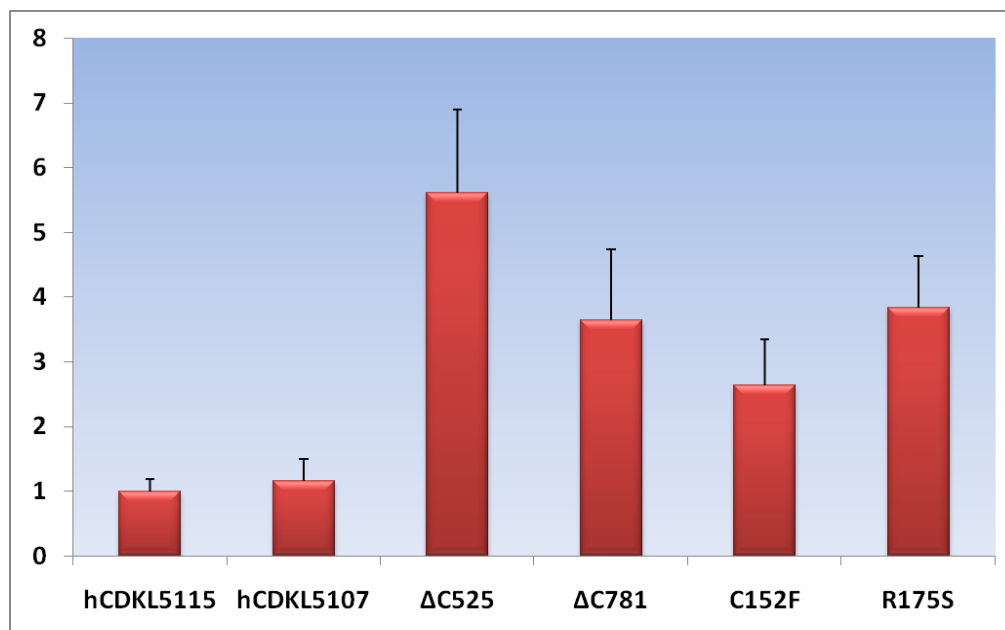


Figura 26. Rappresentazione grafica dei rapporti medi di fluorescenza nucleo/citoplasma calcolati per le proteine di fusione GFP-hCDKL5₁₁₅, GFP-hCDKL5₁₀₇, GFP-hCDKL5 ΔC525, GFP-hCDKL5 ΔC781, GFP-hCDKL5 C152F e GFP-hCDKL5 R175S.

Concludendo, i due costrutti contenenti il cDNA dell'isoforma wild type da 115 kDa risultano avere una distribuzione di fluorescenza tra nucleo e citoplasma paragonabile, così come per quanto riguarda l'isoforma da 107 kDa. I due mutanti troncati ΔC525 e ΔC781 risultano essere tra loro paragonabili, e entrambi significativamente diversi dal wild type di riferimento (115 kDa). La medesima situazione si osserva per i mutanti puntiformi C152F e R175S: entrambi risultano significativamente diversi dalla proteina wild type, ma paragonabili tra loro.

4. Analisi della dinamica molecolare di hCDKL5 in cellule in coltura tramite FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Accertato il profilo di localizzazione di hCDKL5 nelle forme wild type e nei mutanti, si è proceduto all'analisi della dinamica molecolare della proteina, attraverso tecniche di Spettroscopia di Correlazione di Fluorescenza. Allo scopo di comprendere la cinetica di spostamento tra nucleo e citoplasma delle proteine in esame ed un loro eventuale stato di legame alla cromatina, sono stati eseguiti esperimenti di FRAP nucleare (Fluorescence Recovery After Photobleaching). In una prima fase si è scelto di paragonare il costrutto hCDKL5₁₁₅-GFP con il costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅; in una seconda fase sono state paragonate le due forme con il costrutto dell'isoforma alternativa GFP-hCDKL5₁₀₇. Cellule NIH 3T3 esprimenti in maniera transiente le proteine di interesse sono state analizzate, dopo 24 ore dalla transfezione, ad un microscopio confocale Leica. Sono stati presi 5 frames di Pre Bleach, il Bleach è stato eseguito per 6 frames (della durata di 3 secondi ciascuno) e il recupero è stato seguito per 150 frames (1 ogni 5 secondi). Tutti gli esperimenti di FRAP sono stati eseguiti sulla subpopolazione di cellule con una rapporto di fluorescenza nucleo/citoplasma ≈ 1 .

4.1 Dinamica molecolare di hCDKL5₁₁₅: confronto fra GFP-hCDKL5₁₁₅ e hCDKL5₁₁₅-GFP

Tutti gli esperimenti di FRAP sono stati effettuati con gli stessi parametri (vedi Materiali e Metodi 4.1) e il recupero è stato analizzato su 150 frames presi uno ogni 5 secondi. Per il costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅ sono state

analizzate 7 cellule e il grafico in figura 27 corrisponde alla media del recupero.

Il costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅ mostra un recupero della fluorescenza che segue una cinetica esponenziale di primo ordine. Il fitting matematico ha un coefficiente di correlazione R^2 di 0.994.

Il primo parametro utilizzato per analizzare la cinetica del recupero è il $T/2$, ovvero il tempo espresso in secondi che impiega la fluorescenza ad arrivare a metà della fluorescenza massima teorica, calcolato facendo la media tra il valore massimo asintotico e il minimo e interpolando la curva per individuare sulle ascisse il tempo corrispondente.

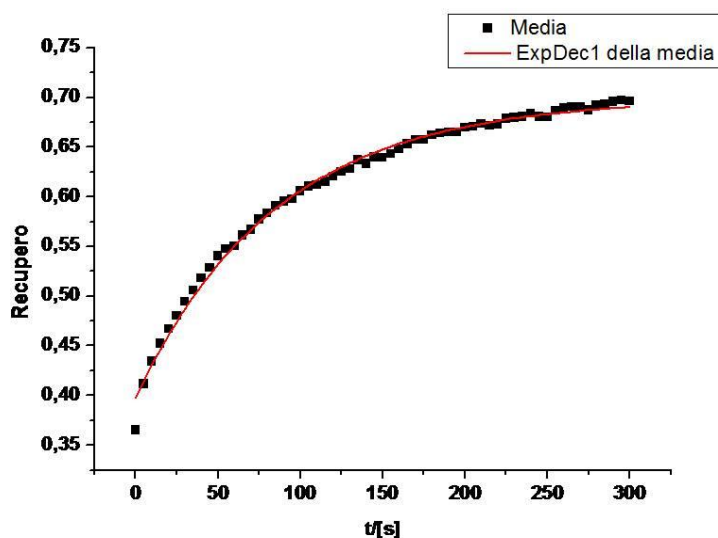


Figura 27. Grafico del recupero della fluorescenza in funzione del tempo per la proteina GFP-hCDKL5..

Il $T/2$ per il costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅ è pari a $45,8 \pm 12,8$ secondi ($n=7$).

Il secondo parametro valutato è la frazione immobile, che corrisponde alla quota di proteina che, una volta fotospenta, rimane legata nel nucleo o nel

citoplasma e non contribuisce al recupero della fluorescenza. Per il costrutto in questione la frazione immobile è pari a $30 \pm 4,4\%$ ($n=7$).

Il costrutto hCDKL5₁₁₅-GFP mostra anch'esso un recupero della fluorescenza che segue una cinetica esponenziale di primo ordine. Il fitting matematico ha un R^2 di 0.97 ($n=6$).

Il $T/2$ è stato calcolato come nel caso precedente, e risulta essere $33.9 \pm 14,2$ secondi. La frazione immobile è pari a $30,2 \pm 6,3 \%$.

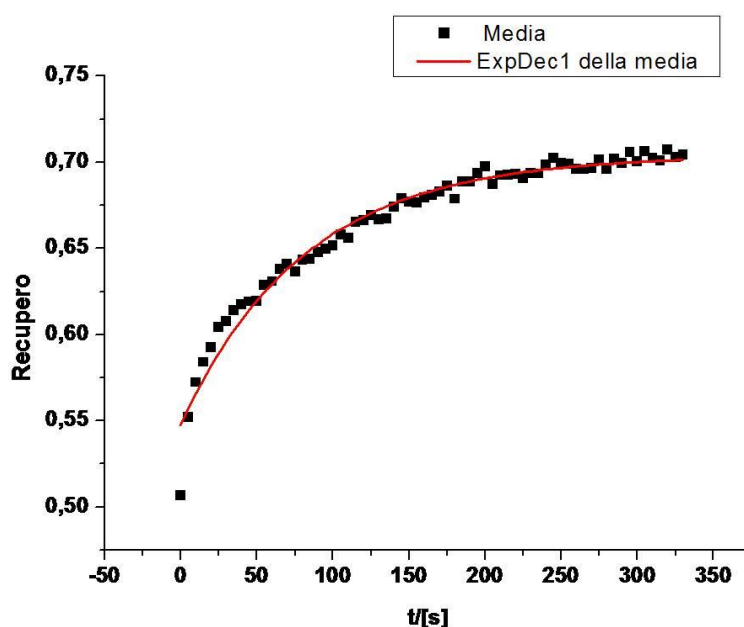


Figura 28. Grafico del recupero della fluorescenza in funzione del tempo per la proteina hCDKL5-GFP.

I costrutti GFP-hCDKL5 e hCDKL5-GFP possono dirsi paragonabili sia nella cinetica del recupero (45,8 contro 33,9 secondi) che nella frazione immobile ($30 \pm 4,4 \%$ contro $30,2 \pm 6,3 \%$) (come dimostrato dall'analisi statistica mediante test t di Student, entrambe le serie di valori non risultano significativamente diverse, $p>0,05$, figura 28).

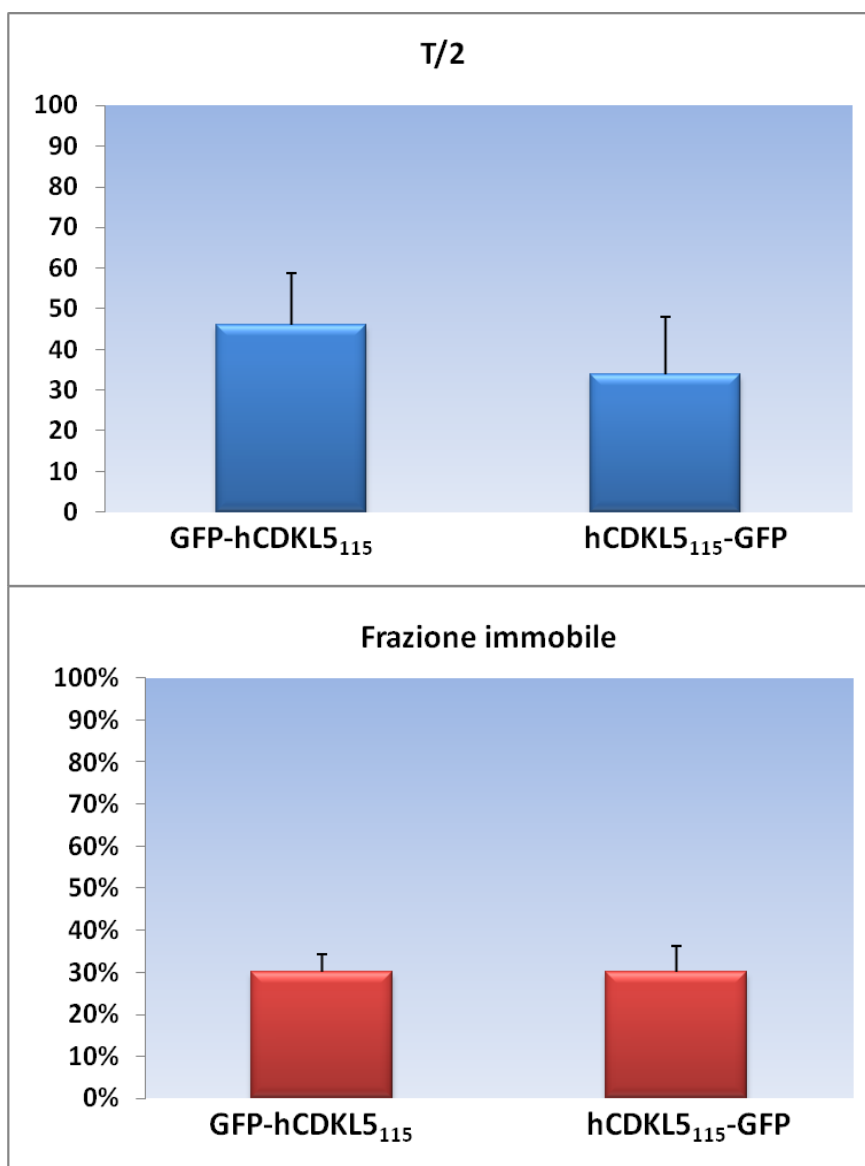


Figura 29. Rappresentazione schematica del T/2 e della frazione immobile di cellule NIH 3T3 trasfettate con i costrutti GFP-hCDKL5₁₁₅ e hCDKL5-GFP₁₁₅

Lo stesso esperimento è stato condotto anche su cellule gliali trasfettate con il costrutto GFP-hCDKL5. Il recupero della fluorescenza segue un andamento esponenziale di primo ordine, e R^2 è pari a 0.97 ($n=6$).

Il T/2 risulta pari a $63,6 \pm 3,07$ secondi. La frazione immobile è $37 \pm 6,02$ %.

I valori ottenuti per il costrutto GFP-hCDKL5 nelle NIH 3T3 e nelle cellule

giali, quando confrontati mediante un test T di Student, non risultano significativamente diversi ($p > 0,05$ sia per il $T/2$ che per la frazione immobile).

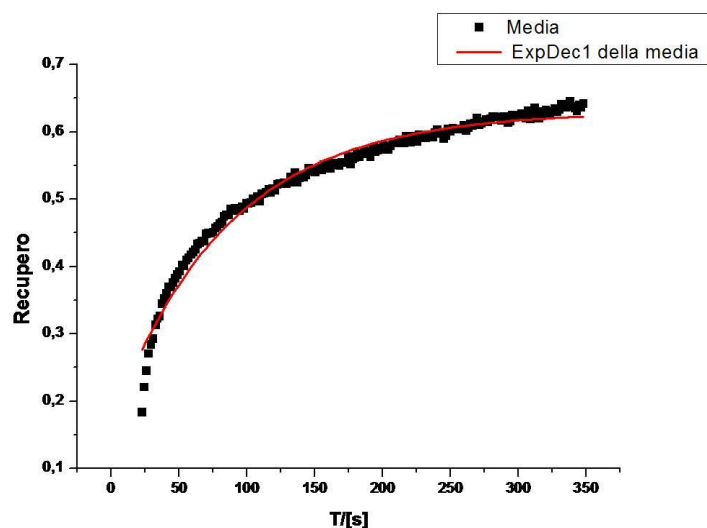


Figura 30. Grafico del recupero della fluorescenza dopo fotospegnimento del nucleo per il costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅ in cellule gliali (n=6).

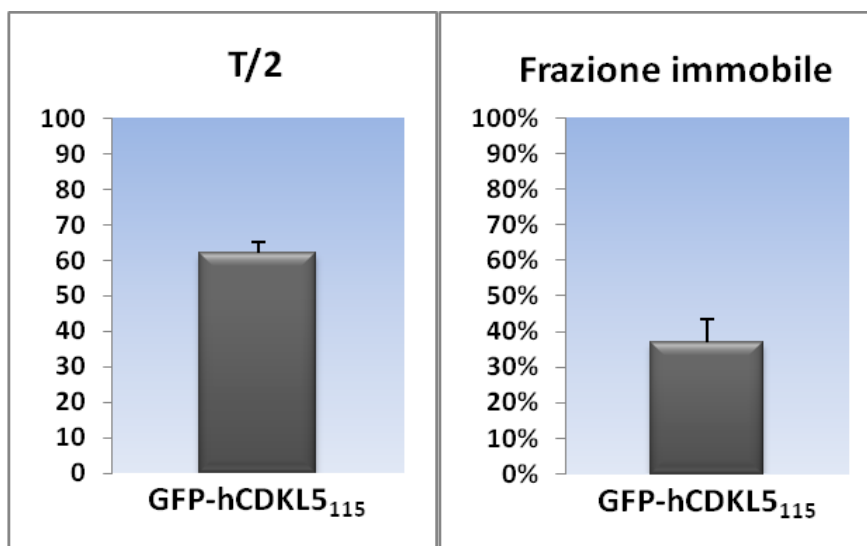


Figura 31. Rappresentazione schematica del $T/2$ e della frazione immobile per il costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅ in cellule gliali.

4.2 Dinamica molecolare di GFP-hCDKL5₁₀₇

Lo stesso esperimento è stato eseguito per esaminare la dinamica molecolare del costrutto di fusione contenente il cDNA dell'isoforma da 107 kDa, avente la GFP fusa all'estremità ammino terminale di hCDKL5. Sono state analizzate sette cellule ed è stata calcolata la media del recupero. Il recupero segue un andamento di tipo esponenziale di primo ordine, e il fitting matematico ha un R^2 di 0,97. Mediante l'analisi dei dati eseguita con il software Origin 8.0 è stato calcolato il T/2 e la frazione immobile. Il T/2 è pari a $37 \pm 9,3$ secondi, mentre la frazione immobile è molto cospicua: il $0,57 \pm 2,65$, cioè il 57% della proteina non contribuisce al recupero della fluorescenza nell'area fotospenta. L'analisi statistica mediante test t di Student non ha mostrato una differenza significativa tra il T/2 misurato per il costrutto da 107 kDa e quello calcolato per i due costrutti wild type da 115 kDa ($45,8 \pm 12,8$ s e $33,9 \pm 14,2$ s rispettivamente per i costrutti GFP-hCDKL5₁₁₅ e hCDKL5₁₁₅-GFP), mentre una differenza significativa si osserva quando si confronta la frazione immobile del costrutto da 107 kDa contro quella misurata per i due costrutti wild type da 115 kDa ($30 \pm 4,4$ % e $30,2 \pm 6,3$ % rispettivamente per GFP-hCDKL5₁₁₅ e hCDKL5₁₁₅-GFP).

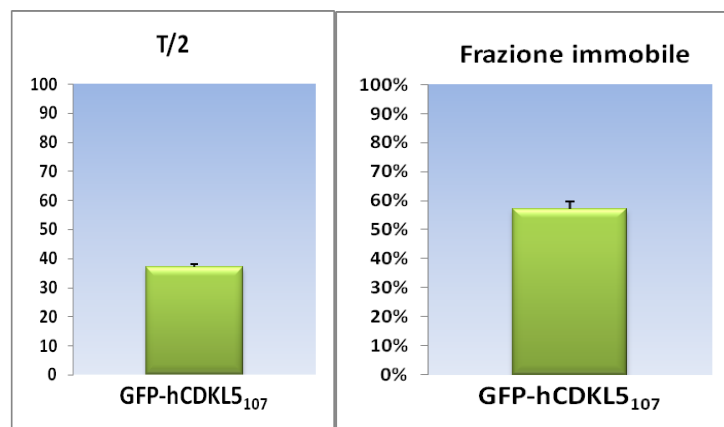


Figura 32. Rappresentazione schematica dei valori di T/2 e della frazione immobile.

5. Analisi di RICS (Raster Image Correlation Spectroscopy)

Gli esperimenti di FRAP sopra descritti hanno evidenziato che la proteina GFP-hCDKL5₁₁₅ si sposta dal nucleo al citoplasma con un T/2 di $45,8 \pm 12,8$ secondi e una frazione immobile di $30 \pm 4,4$ %. Per approfondire quest'ultimo dato e capire i motivi di una così elevata frazione immobile, è stata applicata la tecnica RICS che permette di calcolare il coefficiente di diffusione. Il medesimo approccio è stato adottato anche per le proteine recanti le mutazioni patologiche C152F, R175S, Δ C525 e Δ C781.

5.1 GFP-hCDKL5₁₁₅ : analisi del coefficiente di diffusione nel nucleo e nel citoplasma

L'esperimento è stato condotto su cellule simili tra loro, con una distribuzione omogenea di fluorescenza tra nucleo e citoplasma (rapporto di fluorescenza nuc/cit $0,99 \pm 0,19$). Le acquisizioni sono state effettuate separatamente per il nucleo e il citoplasma. L'analisi delle immagini è stata eseguita con il software Sim FCS impiegando una ROI (Region of Interest) di 128x128 pixel e i coefficienti di diffusione D ottenuti sono stati mediati tra loro. Per quanto concerne il compartimento nucleare, il D medio è $3,85 \pm 0,7$ $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Il D medio ottenuto analizzando il movimento della proteina fluorescente a livello del citoplasma è risultato essere $1,41 \pm 0,4$ $\mu\text{m}^2/\text{s}$, un valore di molto inferiore a quello ottenuto nel nucleo. L'analisi statistica è stata eseguita con un test t di Student tra le coppie di valori di D per ciascuna cellula: i valori di D nel nucleo e nel citoplasma sono risultati significativamente diversi ($p < 0,05$).

Questi dati indicano che la proteina è molto più libera di diffondere a livello del compartimento nucleare, mentre nel citoplasma la tendenza a diffondere è minore.

Per ogni singola cellula è stato calcolato il rapporto tra i D nucleare e citoplasmatico, e di questi è stata calcolata la media, che è risultata essere di $3,5 \pm 1,30$.

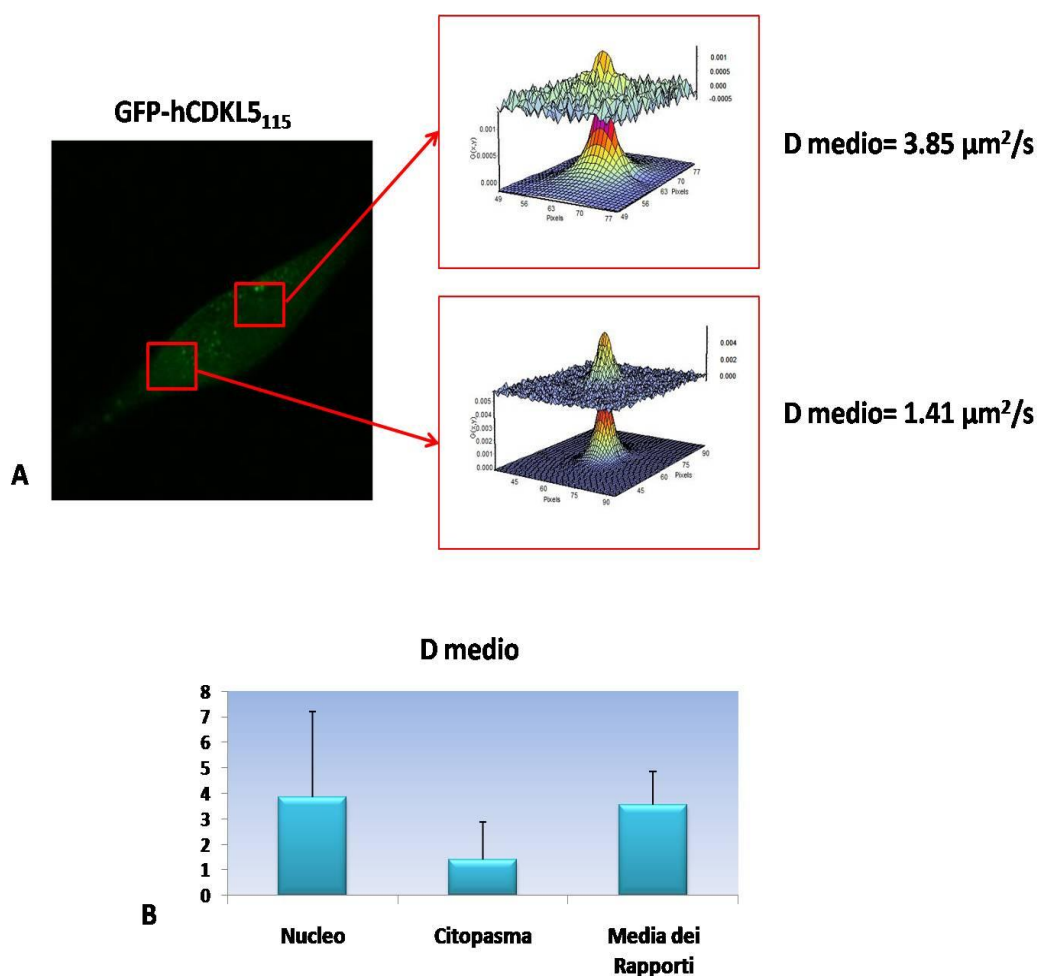


Figura 33. Analisi di cellule NIH 3T3 trasfettate con GFP-hCDKL5₁₁₅. Il rapporto di fluorescenza medio nucleo/citoplasma è di 0.99. Pannello A) L'analisi di RICS è stata eseguita sia sul nucleo che sul citoplasma. Le operazioni di fitting hanno permesso di estrapolare il coefficiente di diffusione D. Pannello B) Rappresentazione schematica dei coefficienti di diffusione D medi del nucleo e del citoplasma. I due valori sono significativamente diversi con $p < 0.05$.

5.2 GFP-hCDKL5 Δ C525 e Δ C781: l'assenza dell'estremità carbossi-terminale altera il pattern di diffusione della proteina

Dagli esperimenti precedenti e in accordo con i dati riportati in letteratura, è emerso che la mancanza di tutto o parte del dominio carbossi terminale porta la proteina ad accumularsi maggiormente nel nucleo. Per verificare se questo accumulo è indice di un'aumentata affinità per il compartimento nucleare, sono stati analizzati il nucleo e il citoplasma di cellule esprimenti i costrutti troncati Δ C525 e Δ C781. In entrambi i casi sono state analizzate cellule con una distribuzione di fluorescenza visibilmente sbilanciata a favore del nucleo (rapporto nuc/cit rispettivamente di $5,6 \pm 1,3$ e $3,64 \pm 1,1$). Anche in questo caso, per l'analisi si è preferito utilizzare una ROI di 128x128 pixel, che permette di selezionare un'area più circoscritta e maggiormente omogenea del compartimento analizzato.

Il coefficiente di diffusione D medio ottenuto nel caso del mutante Δ C525 per il compartimento nucleare è $2.17 \pm 0,68 \mu\text{m}^2/\text{s}$; per il compartimento citoplasmatico è $2.15 \pm 0,99 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Contrariamente a quanto succede nel wild type, i due coefficienti sono molto simili, si va verso un appiattimento delle differenze tra nucleo e citoplasma. In questo unico caso, sembra che il coefficiente di diffusione citoplasmatico sia cresciuto a discapito di quello nucleare, e difatti la media dei rapporti è pari a $1.05 \pm 0,2$, contrariamente a quanto accade a livello della situazione wild type, in cui si osserva un decremento più marcato della diffusività a livello del citoplasma (media dei rapporti nel wild type= $3,55 \pm 1,30$).

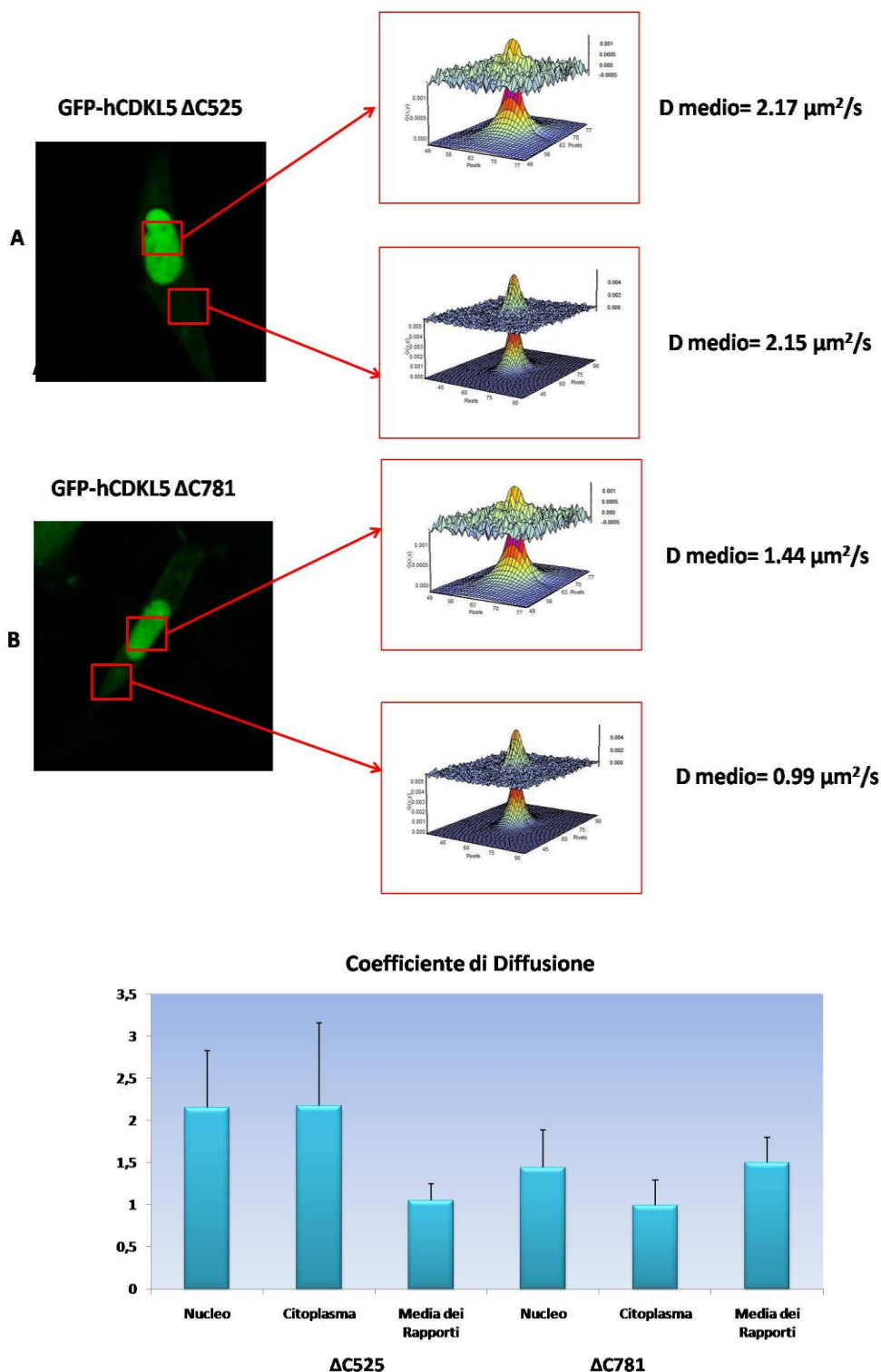


Figura 34. Analisi di cellule NIH 3T3 trasfettate con i costrutti GFP-hCDKL5 $\Delta C525$ e GFP-hCDKL5 $\Delta C781$. Il rapporto di fluorescenza medio nucleo/citoplasma è di 5.6 per il $\Delta C525$ e di 3.64 per il $\Delta C781$. Pannelli A e B) L'analisi di RICS è stata eseguita sia sul nucleo che sul citoplasma. Pannello C) Rappresentazione schematica dei coefficienti di diffusione D medi del nucleo e del citoplasma per i due mutanti. I valori di nucleo e citoplasma sono stati confrontati tra loro e sono risultati significativamente diversi per entrambi i costrutti con $p < 0.05$.

La situazione è molto simile nel caso del mutante patologico $\Delta C781$: il coefficiente D medio nel nucleo è $1.44 \pm 0,45 \mu m^2/s$, mentre nel citoplasma è $0.99 \pm 0,30 \mu m^2/s$. La media dei singoli rapporti calcolata cellula per cellula è $1.5 \pm 0,3$. Si assiste anche in questo caso ad un appiattimento della differenza tra nucleo e citoplasma, ma in maniera più moderata rispetto a quanto accade nel mutante $\Delta C525$. Tuttavia, contrariamente a quanto accade nel mutante $\Delta C525$, in questo caso la diffusività a livello del citoplasma è sensibilmente inferiore di quella nel nucleo, in modo analogo a ciò che si osserva nel caso della proteina wild type. In ogni caso, pur con una piccola differenza, le medie dei rapporti dei D calcolati cellula per cellula per i due mutanti sono molto simili, e difatti le due proteine non risultano significativamente diverse ($p > 0.05$).

5.3 GFP-hCDKL5 C152F e GFP-hCDKL5 R175S: mutazioni sul dominio chinasico alterano la diffusività a livello dei nucleoli

Gli esperimenti preliminari dimostrano che le mutazioni puntiformi localizzate nel dominio chinasico C152F e R175S inducono un cambiamento nella localizzazione della proteina, causando un accumulo peculiare a livello dei nucleoli. Per capire se tale accumulo sia correlato ad un aumento dell'affinità delle proteine mutanti per i nucleoli, è stata eseguita un'analisi di RICS come già descritto in precedenza. Nell'analisi è stata prestata particolare attenzione al coefficiente di diffusione D all'interno dei nucleoli.

L'analisi di RICS è stata eseguita in due fasi: in primo luogo è stato effettuato un confronto a 128×128 pixel del nucleo (escludendo i nucleoli) con il citoplasma (come nei casi precedenti). In un secondo momento è

stata eseguita un'analisi più mirata, a 64x64 pixel, per esaminare la diffusività nei nucleoli, paragonandola al resto del nucleoplasma.

Per la proteina GFP-hCDKL5 C152F il coefficiente di diffusione D medio (calcolato su 7 cellule) a livello del nucleo è pari a $1,45 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$. A livello del citoplasma, il D medio è pari a $0,69 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$. I due valori medi sono risultati significativamente diversi tra loro (test t di Student per dati appaiati, con $p < 0,05$). Infine, è stata calcolata la media dei singoli rapporti tra i valori di D nucleare e citoplasmatico, che è risultato essere pari a $2,35 \pm 0,2$.

Per il costrutto GFP-hCDKL5 R175S la situazione è molto simile: il coefficiente di diffusione D medio calcolato nel nucleoplasma (escludendo i nucleoli) è risultato pari a $1,30 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$; il parametro medio nel citoplasma è pari a $0,68 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$. I due valori sono risultati significativamente diversi tra loro, confermando anche in questo caso una differenza tra la situazione nucleare e quella citoplasmatica (con $p < 0,05$), come si osserva anche nel caso del wild type (D nel nucleo = $3,85 \mu\text{m}^2/\text{s}$, D nel citoplasma = $1,44 \mu\text{m}^2/\text{s}$). La media dei singoli rapporti calcolati per i valori di D nucleare e citoplasmatico di ciascuna cellula è risultata essere $2,65 \pm 0,6$. I due valori medi dei rapporti per i due mutanti ($2,35$ per il C152F e $2,65$ per il R175S9) sono stati confrontati con un test t di Student e non sono risultati significativamente diversi ($p > 0,05$), confermando che le due mutazioni hanno un effetto simile sulla diffusività della proteina.

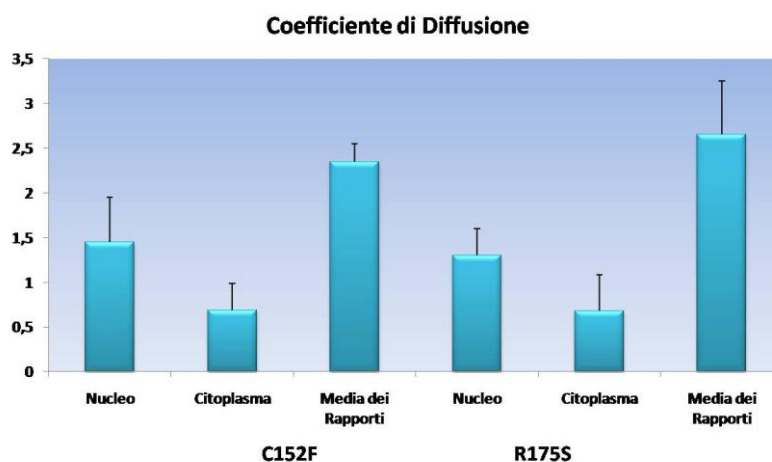
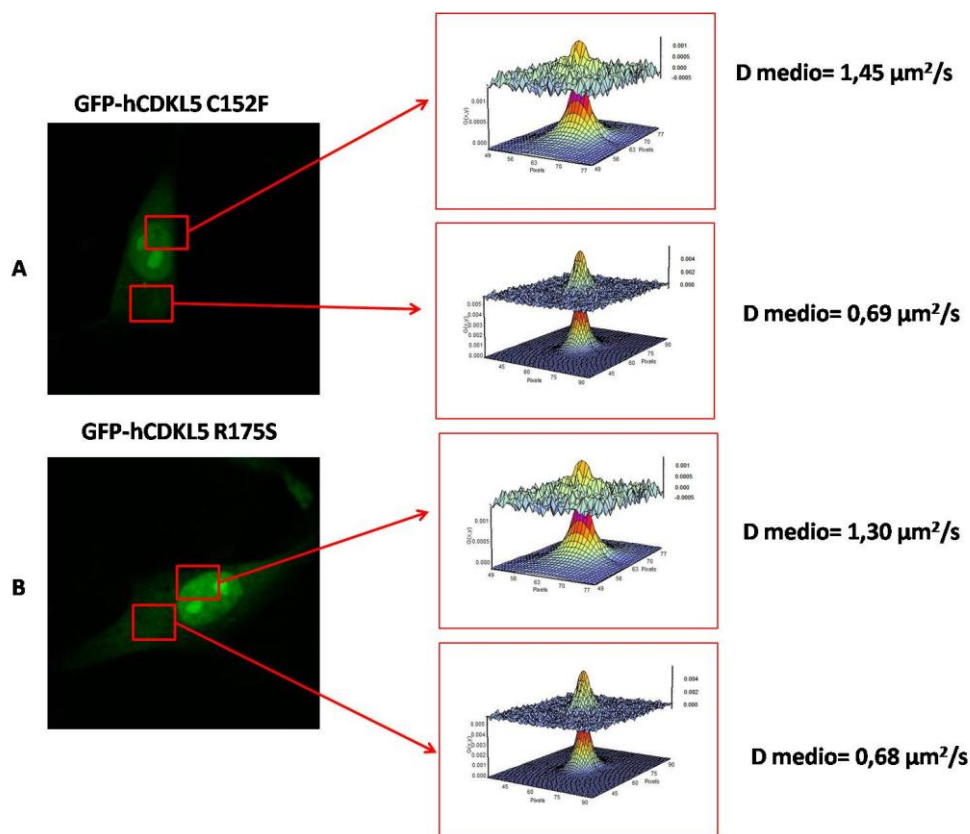


Figura 35. Analisi di cellule NIH 3T3 trasfettate con i costrutti GFP-hCDKL5 C152F e GFP-hCDKL5 R175S. Il rapporto di fluorescenza medio nucleo/citoplasma è di 2,64 per il C152F e di 3,83 per il R175S. Pannelli A e B) L'analisi di RICS è stata eseguita sia sul nucleo, escludendo i nucleoli, che sul citoplasma. Le operazioni di fitting hanno permesso di estrapolare il coefficiente di diffusione D. Pannello C) Rappresentazione schematica dei coefficienti di diffusione D medi del nucleo e del citoplasma per i due mutanti. Il D è più elevato nel nucleo rispetto al citoplasma, in modo paragonabile in entrambi i mutanti. L'analisi statistica a coppie tra nucleo e citoplasma mostra che i coefficienti D tra i 2 compartimenti sono significativamente diversi con $p < 0,05$. I valori medi dei rapporti per i due mutanti sono risultati non significativamente diversi ($p > 0,05$).

In una seconda fase è stata eseguita un'analisi RICS a 64x64 pixel per confrontare la diffusività nei nucleoli, che appaiono più fluorescenti rispetto al resto del nucleoplasma. Per il mutante C152F il valor medio di D nei nucleoli risulta essere $0,81 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$, mentre nel resto del nucleoplasma è nettamente più elevato, $2,02 \pm 0,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$, raggiungendo livelli simili a quanto osservato nell'analisi a 128x128 pixel. La media dei rapporti tra i D nel nucleolo e nel nucleoplasma eseguiti cellula per cellula rivela un valore di $3,62 \pm 0,6$. Nel mutante R175S la situazione è analoga: il valor medio di D nei nucleoli è pari a $0,81 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$; nel resto del nucleoplasma è $2,06 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$. La media dei singoli rapporti di D è $3,19 \pm 0,5$. Il test statistico mostra che i valori di D nel nucleolo e nel nucleoplasma sono significativamente diversi ($p < 0,05$) in entrambi i mutanti; esiste quindi una differenza nella diffusività tra il nucleolo e il resto del nucleoplasma. Il confronto tra i due valori medi dei rapporti tra il D mostra che le due mutazioni hanno un effetto simile sulla diffusività anche a livello dei nucleoli (i due valori non sono significativamente diversi, $p > 0,05$). Da questi dati emergono tre considerazioni:

1. I due mutanti sono molto simili. Questo è vero sia nel caso dell'analisi a 128 pixel del nucleo e del citoplasma, sia nel caso del confronto tra nucleo e nucleoli.
2. I valori di D a livello del nucleo sono significativamente più elevati di quelli nel citoplasma, in modo simile a ciò che accade nel costruito wild type.
3. La mobilità nei nucleoli è estremamente bassa, la proteina recante una delle mutazioni puntiformi diffonde più lentamente di quanto accade nel resto del nucleo.

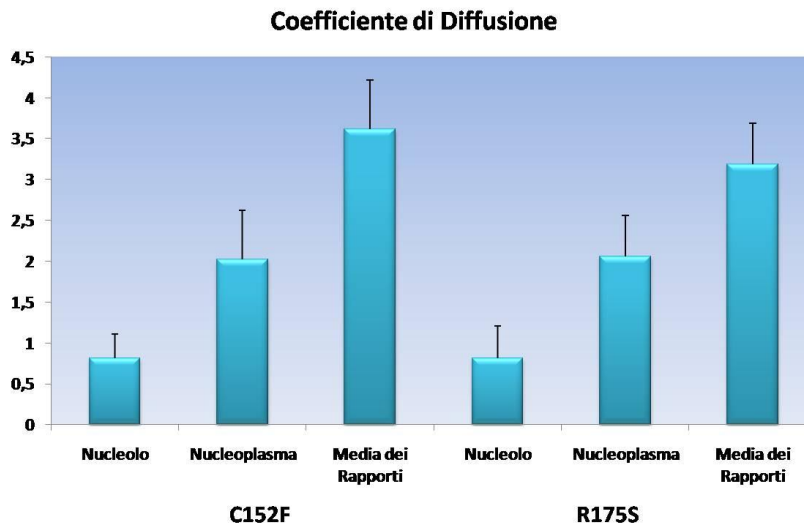
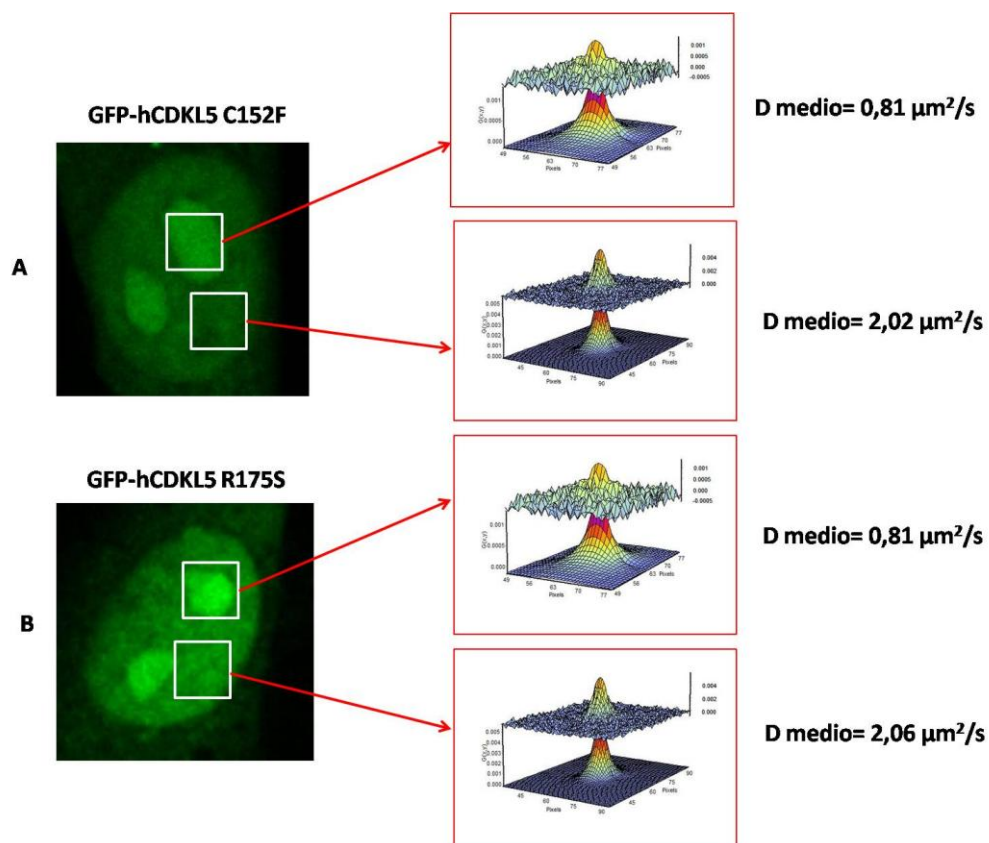


Figura 36. Analisi RICS a 64 pixel della mobilità nei nucleoli contro il resto del nucleoplasma. Pannelli A e B) Analisi dei coefficienti D di diffusione medi nei mutanti C152F e R175S. I valori risultano significativamente diversi tra le due regioni in entrambi i mutanti, con $p < 0,05$. Pannello C) Rappresentazione grafica dei valori di D medi e dei Rapporti medi dei valori di D in ciascuno dei mutanti. I valori dei rapporti medi dei coefficienti D non risultano significativamente diversi ($p > 0,05$).

5.4 Confronto globale dei coefficienti di diffusione D nelle proteine GFP-hCDKL5₁₁₅, GFP-hCDKL5 Δ C525, GFP-hCDKL5 Δ C781, GFP-hCDKL5 C152F e GFP-hCDKL5 R175S

La proteina GFP-hCDKL5₁₁₅ mostra un coefficiente di diffusione D nettamente maggiore nel nucleo rispetto al citoplasma. La media dei singoli rapporti calcolati cellula per cellula dei valori di D risulta essere di $3,55 \pm 1,30$, a fronte di una rapporto di fluorescenza tra nucleo e citoplasma di $0,99 \pm 0,19$. Tale rapporto dimostra che **la proteina wild type si muove più rapidamente nel nucleo, mentre si muove più lentamente a livello del citoplasma** (valore medio di D nel nucleo pari a $3,85 \mu\text{m}^2/\text{s}$ valore medio di D nel citoplasma= $1,41 \mu\text{m}^2/\text{s}$).

Prendendo tale situazione come riferimento, sono stati analizzati i due mutanti troncati GFP-hCDKL5 Δ C525 e GFP-hCDKL5 Δ C781. Tale analisi ha dimostrato che, **in entrambi i mutanti, l'assenza di tutto o parte del dominio carbossi terminale causa una diminuzione della diffusività della proteina a livello del nucleo quando paragonata alla situazione wild type** (valori medi di D nel nucleo $2,17 \mu\text{m}^2/\text{s}$ per il Δ C525, $1,44 \mu\text{m}^2/\text{s}$ per il Δ C781 contro la situazione wild type, con D nel nucleo= $3,85 \mu\text{m}^2/\text{s}$); la situazione nel comparto citoplasmatico appare invece più complessa: si assiste ad un incremento della diffusività nel caso del mutante Δ C525 rispetto al wild type, mentre nel caso del mutante Δ C781 si va incontro ad una diminuzione della diffusività, paragonata alla situazione wild type (D citoplasmatico per il Δ C525= $2,15 \mu\text{m}^2/\text{s}$, D citoplasmatico per il Δ C781= $0,99 \mu\text{m}^2/\text{s}$, D citoplasmatico per il wild type= $1,41 \mu\text{m}^2/\text{s}$).

Nonostante questo, il confronto relativo dei valori di D tra nucleo e citoplasma per ciascun mutante dimostra che **nel citoplasma la proteina**

si muove più lentamente di quanto fa nel nucleo anche quando manca di tutto o parte del dominio carbossi terminale (sebbene questa tendenza sia quasi nulla nel caso del mutante $\Delta C525$). Il valor medio dei rapporti dei D calcolati sulle coppie dei valori di ciascuna cellula (1,05 per il $\Delta C 525$ e 1,49 per il $\Delta C781$) mostra in primo luogo che **i due mutanti sono sovrapponibili**, difatti, quando confrontati con un test t di Student per dati indipendenti, i due valori medi non risultano significativamente diversi ($p>0,05$). In secondo luogo, quando si confronta il valore medio dei rapporti dei D calcolato separatamente per i due mutanti, si osserva che **entrambi differiscono significativamente dalla situazione wild type**, con $p<0,05$ (valor medio dei rapporti D per il $\Delta C525=1,05$, per il $\Delta C781=1,49$, per il wild type=3,55). Questi dati permettono di concludere che **il dominio carbossi terminale ha un ruolo fondamentale nel regolare la capacità di hCDKL5 di diffondere all'interno della cellula e di passare dal nucleo al citoplasma** e viceversa. Tali considerazioni sono supportate anche dall'analisi della localizzazione subcellulare delle due proteine tronche, che mostra come entrambe tendano ad accumularsi nel nucleo (rapporti di fluorescenza nucleo/citoplasma $\gg 1$).

L'analisi dei mutanti puntiformi C152F e R175S ha messo in evidenza l'importanza del dominio chinasi nel regolare la mobilità di hCDKL5 all'interno della cellula. I valori di D calcolati nel nucleo sono pari a $1,45 \mu m^2/s$ per il mutante C152F e a $1,30 \mu m^2/s$ per il mutante R175S. Anche in questo caso il confronto con la situazione wild type evidenzia un **decremento della diffusività nel nucleo dei mutanti paragonata alla situazione wild type** (valore di riferimento D nucleare di hCDKL5 wild type= $3,85 \mu m^2/s$). I valori di D calcolati nel citoplasma nel caso dei due mutanti risultano essere $0,69 \mu m^2/s$ per il C152F e $0,68 \mu m^2/s$ per il R175S,

entrambi visibilmente inferiori al valore calcolato nel caso del wild type (valore di riferimento D citoplasmatico del wild type=1,41 $\mu\text{m}^2/\text{s}$). Per entrambi i mutanti, **c'è un decremento della diffusività a livello del citoplasma in paragone alla situazione wild type.**

Tuttavia, **per entrambi è mantenuto il trend che vede la proteina diffondere più rapidamente nel nucleo rispetto al citoplasma,** come accade alla proteina wild type e ai due mutanti troncati.

L'analisi statistica ha dimostrato che **i due mutanti puntiformi sono significativamente diversi dal wild type**, con $p > 0,05$ (media dei rapporti di D per il mutante C152F=2,35, media dei rapporti di D per il mutante R175S=2,65, media dei rapporti di D per il wild type=3,55). Il confronto dei rapporti di D calcolati singolarmente per ciascuna cellula mostra che **i due mutanti sono tra loro paragonabili** (2,35 per il C152F e 2,65 per il R175S, i due valori non risultano significativamente diversi, $p < 0,05$).

Concludendo, dall'analisi di RICS a 128x128 pixel emerge che le alterazioni del dominio chinamico e la mancanza di tutto o parte del dominio carbossi terminale condizionano la mobilità a livello del nucleo, determinando un rallentamento della proteina a livello di tale compartimento. La situazione a livello del citoplasma segue la tendenza del wild type, ed è più lenta rispetto al nucleo in tutti i costrutti mutanti analizzati. Nonostante il trend che vede il coefficiente di diffusione diminuire dal nucleo al citoplasma sia mantenuto per tutti i mutanti, risultano tutti significativamente diversi dalla situazione wild type, a riprova del fatto che **le alterazioni nel dominio chinamico e in quello carbossi terminale causano un'alterazione della diffusività di hCDKL5 all'interno della cellula.**

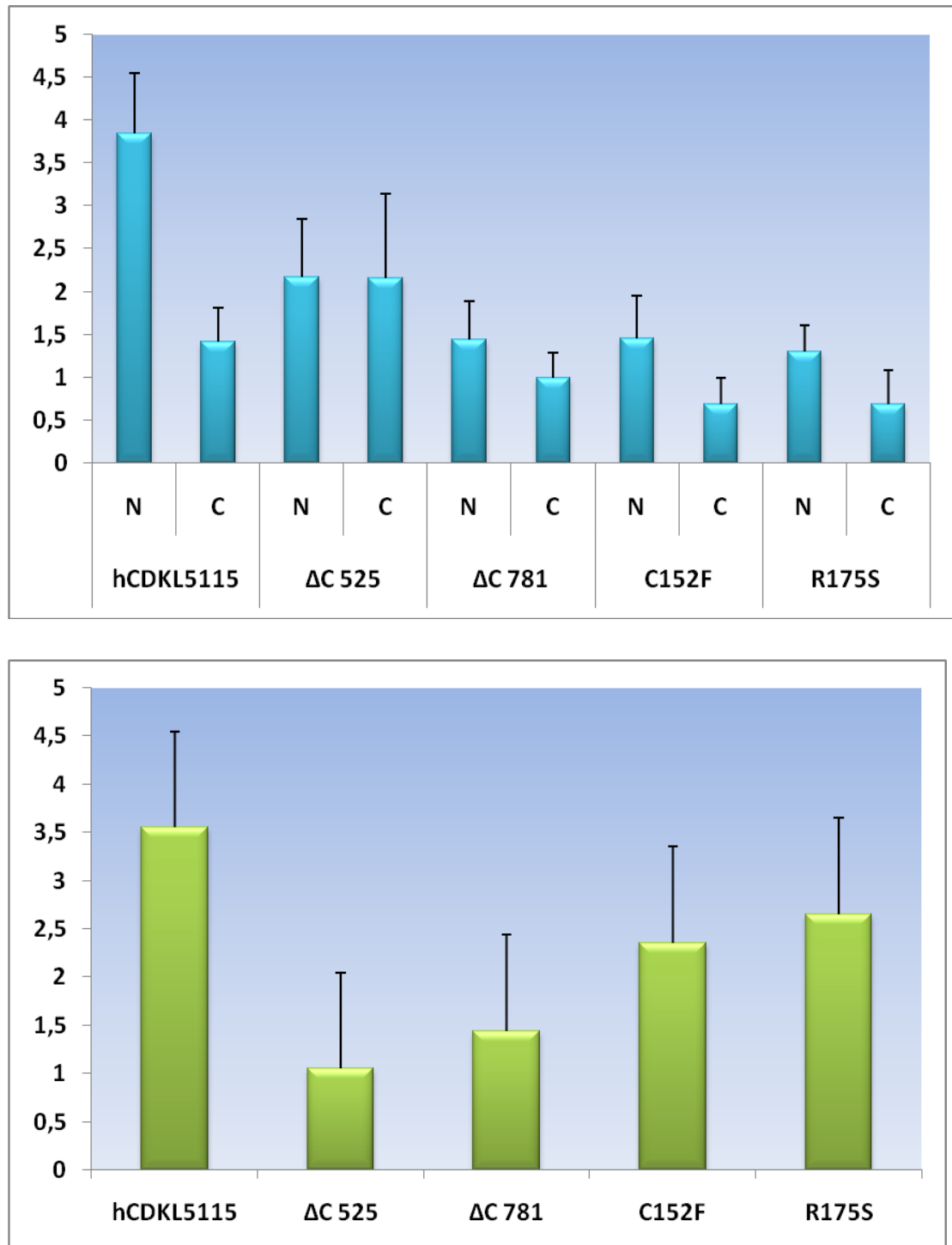


Figura 37. In alto: rappresentazione grafica dei valori di D nel nucleo e nel citoplasma calcolati per le proteine wild type 115kDa, Δ C525, Δ C781, C152F e R175S. Per ogni proteina è stato eseguito un confronto tra i valori nucleare e citoplasmatico. In basso, rappresentazione grafica dei valori medi dei rapporti tra i D nucleare e citoplasmatico per le medesime proteine. Questo parametro ci ha permesso di confrontare le proteine tra loro.

Le proteine recanti le mutazioni puntiformi C152F e R175S causano anche un peculiare accumulo di fluorescenza nei nucleoli. L'analisi di RICS a 64 pixel ha dimostrato che **la mobilità nei nucleoli è vistosamente diminuita** (D per il C152F=0,81 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, D per il R175S=0,81 $\mu\text{m}^2/\text{s}$) quando paragonata con l'analisi a 64 pixel di una regione del nucleo libera dai nucleoli (D per il C152F= 2,02 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, D per il R175S= 2,06 $\mu\text{m}^2/\text{s}$). Non è stato possibile confrontare questo dato con la situazione wild type poiché in quest'ultimo caso non si osserva, a livello dei nucleoli, un comportamento diffusivo differente dal resto del nucleoplasma. Da quest'ultima serie di dati emerge che alterazioni del dominio chinasi determinano un'alterazione della mobilità di hCDKL5 a livello dei nucleoli.

DISCUSSIONE

La Sindrome di Rett è una patologia del neurosviluppo i cui meccanismi patogenetici restano ancora in gran parte da chiarire. Sono stati individuati tre geni le cui mutazioni portano allo sviluppo di forme più o meno gravi della malattia, ma rimangono ancora da chiarire molti dei collegamenti tra le alterazioni genetiche e il fenotipo osservato. *MeCP2* è stato il primo gene ad essere scoperto come correlato alla Sindrome di Rett: nel 1999 Amir e colleghi identificarono 3 mutazioni sul gene *MeCP2* in 3 pazienti affetti dalla forma classica (Amir, Van den Veyver et al. 1999). Alcuni anni più tardi, nel 2008, Ariani e colleghi identificarono *FOXP1* come un altro gene che, quando mutato, porta allo sviluppo della Sindrome di Rett nella sua Variante congenita (Ariani, Hayek et al. 2008). Tuttavia, il gene meno studiato è *CDKL5*. Questo gene codifica per una serina treonina chinasi con elevata omologia di sequenza per i geni delle MAP chinasi e delle Chinasi-ciclina dipendenti. È stato individuato durante un mappaggio della regione 22 del braccio corto del cromosoma X nel 1998 (Montini, Andolfi et al. 1998); la sua correlazione con la Sindrome di Rett è stata messa in evidenza solamente nel 2003 da Kalscheuer e colleghi. Questo gruppo identificò, in due bambine affette dalla variante con crisi epilettiche ad esordio precoce della Sindrome di Rett una traslocazione reciproca tra il braccio corto del cromosoma X e un autosoma; tale traslocazione distrugge il gene *CDKL5* dimostrando che l'assenza della proteina è causa dello sviluppo della patologia (Kalscheuer, Tao et al. 2003).

La localizzazione, la funzione e il possibile ruolo funzionale di *CDKL5* nel quadro patologico della Sindrome di Rett rimangono ancora in gran parte da chiarire. Per tentare di comprendere qualcosa di più su alcuni di questi aspetti, durante il mio periodo di tesi sono stati effettuati in primo luogo

esperimenti di imaging su cellule viventi, per chiarire il profilo di localizzazione della proteina nelle forme wild type e mutanti; in un secondo momento, sono state eseguite delle analisi di FRAP e di RICS, per comprendere la dinamica della proteina a livello intracellulare, la sua cinetica di spostamento dal nucleo al citoplasma e la sua affinità per il compartimento nucleare e citoplasmatico; in quest'ultima fase sono state esaminate alcune forme mutanti della proteina, e sono emerse evidenze interessanti circa il ruolo di alcuni domini funzionali. In particolare è stato dimostrato che:

1. La forma wild type di hCDKL5 da 115 kDa è presente sia nel nucleo che nel citoplasma; questo è valido per la proteina endogena e per le proteine di fusione GFP-hCDKL5₁₁₅ e hCDKL5₁₁₅-GFP.
2. Le proteine GFP-hCDKL5₁₁₅ e hCDKL5₁₁₅-GFP mostrano una localizzazione e una cinetica sovrapponibile in cellule in coltura.
3. hCDKL5 svolge un ruolo importante a livello del citoplasma.
4. La forma wild type alternativa da 107 kDa mostra una cinetica differente rispetto alla forma da 115 kDa.
5. Il dominio carbossi terminale della proteina guida la localizzazione subcellulare e influisce sulla diffusività.
6. Alterazioni del dominio chinasi causano una mislocalizzazione della proteina nei nucleoli.

1. hCDKL5 è presente sia nel nucleo che nel citoplasma

La localizzazione di hCDKL5₁₁₅ in cellule viventi da noi osservata nel caso della proteina endogena e delle proteine di fusione GFP- hCDKL5₁₁₅ e hCDKL5₁₁₅-GFP ricalca quella riportata in letteratura da Bertani e colleghi (Bertani, Rusconi et al. 2006). La proteina è presente sia nel compartimento nucleare che in quello citoplasmatico. Sono presenti cellule in cui la fluorescenza è più marcata nel nucleo, altre in cui è il citoplasma la regione in cui è più elevata l'espressione della proteina, e infine cellule in cui la distribuzione è pressochè omogenea (vedi figura 20). La localizzazione della forma wild type alternativa hCDKL5₁₀₇ è simile a quanto osservato nel caso della proteina da 115 kDa (vedi figura 22). Un aspetto interessante di tale isoforma è una particolare localizzazione punteggiata a livello del nucleo che potrebbe essere assimilabile alle speckles nucleari, in accordo con quanto osservato da Ricciardi e colleghi (Ricciardi, Kilstrup-Nielsen et al. 2009). Per quanto riguarda il costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅, la localizzazione osservata nelle cellule NIH 3T3 è mantenuta anche in cellule gliali primarie.

La natura delle vescicole intensamente fluorescenti a livello del citoplasma che si osservano in entrambe le forme wild type è ancora ignota; è stato possibile tuttavia escludere, utilizzando il marcatore lisosomiale LysoTracker, che non si tratta di lisosomi. Inoltre, occorre fare un distinguo tra le piccole vescicole disseminate in modo uniforme in tutto il citoplasma e i grossi ammassi che si osservano generalmente in prossimità del nucleo. Nel primo caso le vescicole si osservano anche nell'immunocitochimica in presenza della sola proteina endogena, ed è quindi possibile escludere che si tratti di artefatti causati dalla trasfezione.

Nel secondo caso, gli ammassi di dimensioni maggiori si osservano solamente nelle cellule trasfettate overesprimenti; date le notevoli dimensioni della proteina, e considerato che tale fenomeno si osserva solamente per le isoforme wild type, funzionalmente attive, e non si osserva per le forme mutanti, è possibile ipotizzare che in questo caso le cellule vadano incontro a fenomeni di citotossicità in seguito alla trasfezione, e gli accumuli citoplasmatici potrebbero essere in realtà delle vescicole di deposito in cui la proteina viene accumulata in attesa di essere smaltita. Saranno necessari ulteriori esperimenti per chiarire la natura dei due tipi di vescicole.

La presenza di hCDKL5 in entrambi i compartimenti subcellulari induce a ipotizzare che la proteina possa avere molteplici ruoli all'interno della cellula; in accordo con i dati presenti in letteratura, nel nucleo hCDKL5 potrebbe agire di concerto con MeCP2 fosforilandolo, come sostenuto da Mari e colleghi (Mari, Azimonti et al. 2005); in alternativa, come sostenuto da Kameshita e colleghi, nel nucleo la proteina potrebbe interagire con MeCP2 a livello di un interattore comune, la DNMT1, inserendosi in un pathway di rimodellamento della cromatina (Kameshita, Sekiguchi et al. 2008). Infine, potrebbe agire a livello delle speckles nucleari, regolando la mobilitazione di fattori di splicing, come suggerito da Ricciardi e colleghi (Ricciardi, Kilstrup-Nielsen et al. 2009). Il suo ruolo a livello del citoplasma potrebbe essere invece direttamente correlato alla maturazione dei neuroni; secondo Chen e colleghi hCDKL5 interagisce con Rac1, inserendosi nel pathway delle Rho-GTPasi, contribuendo alla morfogenesi dendritica (Chen, Zhu et al. 2010).

2. Le proteine GFP-hCDKL5 e hCDKL5-GFP hanno localizzazioni e cinetiche analoghe nel modello cellulare NIH 3T3

Una volta appurata la localizzazione dell'isoforma wild type da 115 kDa, è stata analizzata la sua dinamica molecolare attraverso esperimenti di FRAP e di RICS. In base alle misure di FRAP risulta che la proteina wild type si sposta dal nucleo al citoplasma con una cinetica relativamente veloce, considerato che, con tutta probabilità, entra ed esce dal nucleo in virtù di un meccanismo di trasporto attivo (hCDKL5 ha un peso molecolare di 115 kDa). In base al lavoro di Cardarelli e colleghi, appare evidente che una proteina di tali dimensioni priva di segnali di localizzazione ed esportazione nucleare non potrebbe attraversare la membrana nucleare per semplice diffusione. Il limite di diffusione del poro nucleare si aggira intorno ai 60 kDa: la GFP, che pesa 27 kDa, così come il dimerico di GFP (GFP₂), 54 kDa, attraversano la membrana nucleare per diffusione passiva e mostrano una localizzazione uniforme, sia nucleare che citoplasmatica; al contrario, il tetramero di GFP (GFP₄), di 110 kDa, mostra una localizzazione esclusivamente citoplasmatica ed è escluso dal nucleo (Cardarelli, Serresi et al. 2007).

La cinetica di spostamento tra nucleo e citoplasma è stata analizzata sia per il costrutto GFP-hCDKL5 che per il costrutto hCDKL5-GFP. I due costrutti mostrano un T/2 simile, statisticamente non significativamente diverso: per il GFP-hCDKL5 il T/2 è di 45,8 secondi, per il costrutto alternativo il T/2 misura 33,9 secondi ($p > 0,05$) (vedi figure 26, 27 e 28). La frazione immobile misurata è invece identica, e raggiunge il 30% in entrambi i casi. Si può quindi concludere che i due costrutti hanno la

stessa cinetica all'interno delle cellule NIH 3T3 e possono essere considerati sovrapponibili, questo anche a fronte di una localizzazione subcellulare identica. Per questo motivo, gli esperimenti successivi sono stati eseguiti sul solo costrutto GFP-hCDKL5₁₁₅.

Sono state inoltre eseguite delle misure di FRAP su cellule gliali primarie. Rispetto a quanto osservato nelle cellule NIH 3T3 il T/2 nelle cellule gliali risulta leggermente più elevato (63,6 secondi) così come la frazione immobile, il 37% (vedi figura 30 e 31). L'analisi statistica ha però dimostrato che le due situazioni non sono significativamente differenti ($p > 0,05$). Possiamo quindi concludere che le cellule NIH 3T3 sono un buon modello per studiare la mobilità e la cinetica di hCDKL5.

3. hCDKL5 svolge un ruolo importante nel citoplasma

I dati di FRAP della forma wild type di hCDKL5₁₁₅ mostrano che questa si sposta tra il compartimento nucleare e quello citoplasmatico con una cinetica compatibile con una meccanismo di trasporto attivo sia in ingresso che in uscita; il T/2 misurato oscilla tra 33,9 a 45,8 secondi. Questo significa che, in seguito al fotospegnimento del nucleo, occorrono tra i 33,9 e i 45,8 secondi affinché il 50% della fluorescenza massima teorica venga recuperata. La frazione immobile risulta il 30%; quest'ultimo dato suggerisce che la proteina sia legata ad alta affinità al compartimento nucleare o a quello citoplasmatico. Nella prima ipotesi, la proteina sarebbe legata all'interno del nucleo, ad esempio alla cromatina, e per questo motivo la proteina fotospenta non riuscirebbe ad essere completamente sostituita dalla quota di proteine fluorescenti che provengono dal citoplasma. Nella seconda ipotesi, il recupero non sarebbe completo

perché la proteina citoplasmatica (e quindi fluorescente) potrebbe fare parte di un complesso di legame a livello del citoplasma, che le impedisce di andare a contribuire alla sostituzione delle molecole fotospente a livello del nucleo.

Per tentare di comprendere quale di queste due situazioni sia quella più plausibile, sono stati eseguiti degli esperimenti di RICS; tali misure permettono di risalire al coefficiente di diffusione della proteina all'interno della cellula, e permettono di analizzare in modo distinto la diffusività a livello del nucleo e del citoplasma. Dalle analisi è emerso che il valore del coefficiente di diffusione di hCDKL5₁₁₅ nel nucleo è pari a 3,85 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, mentre nel citoplasma è sensibilmente inferiore, 1,41 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (vedi figura 33). Un valore di D nel nucleo più elevato rispetto a quello nel citoplasma indica che nel nucleo la proteina è più libera di diffondere di quanto non lo sia nel citoplasma; questo porta ad ipotizzare che nel citoplasma la proteina partecipi al legame con qualche complesso o struttura, e di conseguenza sia meno libera di diffondere di quanto invece non faccia nel nucleo. Correlando questi dati con quelli ottenuti per FRAP, l'ipotesi più valida appare essere la seconda: la proteina ha una frazione immobile così elevata poiché svolge un ruolo a livello del citoplasma, che non le consente di diffondere liberamente, per traslocare nel nucleo e partecipare al completo recupero della fluorescenza in seguito a fotospegnimento. Questi dati sembrano supportare il modello proposto da Chen e colleghi, secondo i quali hCDKL5, interagendo con Rac1 e inserendosi nel pathway delle Rho GTPasi, avrebbe un ruolo nel regolare la polimerizzazione della F actina, contribuendo alla morfogenesi dendritica (Chen, Zhu et al. 2010).

4. La forma wild type alternativa hCDKL5₁₀₇ mostra una cinetica differente rispetto alla forma da 115 kDa

L'isoforma wild type alternativa hCDKL5₁₀₇ mostra una cinetica leggermente dissimile da quanto osservato per la forma da 115 kDa. A fronte di un T/2 sovrapponibile, corrispondente a 37 secondi (non significativamente diverso da quello ottenuto per la forma hCDKL5₁₁₅, con $p>0,05$), la frazione immobile risulta molto più elevata: il 57% della proteina non contribuisce al recupero della fluorescenza (il dato ottenuto per la forma da 107 kDa e per quella da 115 kDa è significativamente diverso, vedi figura 32). Questo dato, come nel caso precedente, suggerisce che la proteina sia trattenuta a livello di complessi di legame al nucleo o al citoplasma. I dati illustrati dagli autori che per primi hanno descritto questa forma nel 2011, indicano che hCDKL5₁₀₇ è la forma predominante a livello dei tessuti adulti, sia nel topo che nell'uomo, risultando da 10 a 100 volte più espressa rispetto alla forma da 115 kDa. Il testicolo è l'unico tessuto che fa eccezione, con un livello di espressione di hCDKL5₁₁₅ 2,5 volte superiore rispetto alla hCDKL5₁₀₇. Secondo i dati degli autori, il cervello esprime 37 volte di più la forma alternativa da 107 kDa rispetto a quella da 115 kDa. L'isoforma da 107 kDa sembra quindi essere la forma predominante nel cervello (Williamson, Giudici et al. 2011).

Esclusivamente sulla base di queste osservazioni, è probabile che anche per questa isoforma la ragione dell'elevata frazione immobile possa essere ricercata nel suo ruolo citoplasmatico di collaborazione alla morfogenesi dendritica, considerato che questa isoforma è la più espressa a livello celebrale. Purtroppo, la carenza di informazioni ulteriori riguardanti

questa isoforma, e l'impossibilità di eseguire delle misure di RICS per la proteina GFP-hCDKL5₁₀₇ rende al momento impossibile validare tale speculazione.

5. Il dominio carbossi terminale influenza la localizzazione subcellulare di hCDKL5

Le analisi di imaging su cellule viventi esprimenti le proteine mutanti $\Delta C525$ e $\Delta C781$ hanno mostrato un'alterazione nel profilo di localizzazione subcellulare rispetto alla proteina wild type. Come si può osservare in figura 25, e in accordo con i risultati ottenuti da Rusconi e colleghi (Rusconi, Salvatoni et al. 2008), entrambe le proteine mostrano un vistoso accumulo di fluorescenza a livello del nucleo. I rapporti di fluorescenza nucleo/citoplasma sono sensibilmente più elevati rispetto a quanto osservato per la proteina wild type (che ha un rapporto di fluorescenza nucleo/citoplasma ~ 1). Nel caso del mutante di sintesi $\Delta C525$, che è privo di tutto il dominio carbossi terminale, il rapporto di fluorescenza è pari a 5,6; il rapporto è lievemente più simile al valore calcolato per il wild type nel caso del mutante patologico $\Delta C781$ (rapporto di fluorescenza nucleo/citoplasma pari a 3,64). Da questi dati emergono due osservazioni: in primo luogo, sembra che il dominio carbossi terminale svolga un ruolo chiave nel regolare l'esportazione di hCDKL5 dal nucleo. L'importanza di tale dominio è messa ulteriormente in evidenza dal confronto fra i due mutanti: il rapporto di fluorescenza nucleo/citoplasma è più elevato nel caso del mutante $\Delta C525$, che manca di tutto il dominio carbossi terminale, mentre decresce, ritornando lievemente più simile al rapporto calcolato per le cellule wild type, nel

caso del mutante $\Delta C781$, che preserva una porzione di tale dominio. L'importanza del dominio carbossi terminale nella regolazione della localizzazione subcellulare di hCDKL5 potrebbe essere dovuta alla presenza, al suo interno, di una regione ricca in leucine, posizionate nei residui 836-845, con elevata omologia di sequenza con la consensus del segnale di esportazione nucleare (NES) riconosciuto dall'esportina 1 (CRM1). In base ai dati di Rusconi e colleghi, in seguito al trattamento con l'inibitore di CRM1, LMB, anche la proteina wild type mostra un vistoso accumulo nel nucleo (Rusconi, Salvatoni et al. 2008). Il meccanismo alla base della regolazione della localizzazione di hCDKL5 potrebbe quindi essere, almeno in parte, dovuta all'azione di CRM1, e la mancanza dei residui 836-845 contenuti nel dominio carbossi terminale sarebbe alla base della mislocalizzazione che si osserva nei due mutanti $\Delta C525$ e $\Delta C781$. A sua volta, la mancata esportazione nel citoplasma del mutante patologico $\Delta C781$ potrebbe essere il meccanismo alla base del fenotipo patologico che si osserva nei pazienti portatori di tale mutazione; ciò induce a pensare che hCDKL5 possa avere un ruolo fondamentale a livello del citoplasma, in modo particolare a livello dei neuroni in corso di differenziamento, come ipotizzato da Chen e colleghi. Appurata la localizzazione subcellulare, è stata analizzata la diffusività delle due proteine nel nucleo e nel citoplasma tramite RICS (vedi figura 34). Nel caso del mutante $\Delta C525$ si osserva una diminuzione della diffusività nel nucleo e un contemporaneo aumento nel citoplasma (D nucleare; $2,17 \mu m^2/s$, D citoplasmatico; $2,15 \mu m^2/s$) quando paragonata con la situazione wild type (D nucleare wild type; $3,85$, D citoplasmatico; $1,41$). Il rapporto dei due valori (≈ 1) è indice dell'appiattimento della differenza tra i coefficienti di diffusione che si osserva in questo mutante. La diminuzione della

diffusività nel nucleo è difficile da interpretare, in assenza di ulteriori informazioni, ma potrebbe essere dovuta alla perdita, in questo mutante, di una regione importante che regola il legame della proteina a livello di strutture nel nucleo. Tale regione, che resta da individuare, potrebbe regolare, ad esempio tramite meccanismi di fosforilazione e defosforilazione, il legame o il distacco di hCDKL5 dal complesso di legame a MeCP2 e DNMT1 a livello della cromatina, secondo il modello ipotizzato da Kameshita e colleghi. La mancanza di tale regione potrebbe prolungare il legame della proteina al complesso, impedendone il distacco e causando quindi un abbassamento del coefficiente di diffusione. Tale considerazione resta solo un'ipotesi e necessita di ulteriori conferme. A livello citoplasmatico, l'aumento della diffusività rispetto alla proteina wild type potrebbe essere dovuto ad un'incapacità della proteina tronca di interagire correttamente con Rac1 e quindi di svolgere il suo compito nella morfogenesi dendritica. Secondo Chen e colleghi infatti, il dominio di interazione con Rac1 risiede nella regione costituita dai residui 670-934 di hCDKL5 (Chen, Zhu et al. 2010). La mancanza di tale dominio impedirebbe a hCDKL5 di legare Rac1, contribuendo all'aumento della diffusività nel citoplasma. Il dominio carbossi terminale sarebbe dunque fondamentale in entrambi i compartimenti per il corretto funzionamento della proteina.

La situazione riguardante il mutante patologico $\Delta C781$ è più complessa da interpretare. La mappa di diffusività è più simile alla situazione wild type. Anche nel caso del mutante $\Delta C781$ il coefficiente nel nucleo subisce un abbassamento rispetto alla situazione wild type ($1,44 \mu\text{m}^2/\text{s}$ contro $3,85 \mu\text{m}^2/\text{s}$ del wild type); la ragione di questo abbassamento può essere

spiegata in modo analogo a quanto detto per il mutante $\Delta C525$. Nel mutante $\Delta C781$ il coefficiente di diffusività a livello del citoplasma è più basso rispetto a quello nel nucleo, come accade per la proteina wild type (rispettivamente $0,99 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nel citoplasma e $1,44 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nel nucleo per il mutante $\Delta C781$, $1,41 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nel citoplasma e $3,85 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nel nucleo per il wild type). In questo senso, è possibile che il mutante $\Delta C781$, che preserva una porzione del dominio carbossi terminale, sia più simile alla proteina wild type; il mutante $\Delta C525$ invece, che manca di tutto il dominio carbossi terminale, mostra un coefficiente di diffusione D nel nucleo e nel citoplasma quasi identico. Esiste quindi un'alterazione nel rapporto di diffusività tra nucleo e citoplasma, che potrebbe essere alla base del malfunzionamento della proteina sia nel nucleo che nel citoplasma. Questa situazione appare più marcata per il mutante $\Delta C525$, privo di tutto il dominio carbossi terminale, mentre la situazione del mutante $\Delta C781$ appare lievemente più simile a quella wild type. Questi dati messi assieme indicano che il dominio carbossi terminale ha un'importanza centrale nel regolare la localizzazione subcellulare della proteina e di conseguenza la sua funzione. Le alterazioni nel trasporto osservate nei modelli cellulari da noi osservate potrebbero essere alla base della severità del fenotipo patologico di pazienti portatori di tali mutazioni.

6. Alterazioni del dominio chinamico causano una mislocalizzazione di hCDKL5 nei nucleoli

Le mutazioni missenso C152F e R175S cadono entrambe all'interno del dominio serina-treonina chinamico (residui 11-297). Sin dalla scoperta di hCDKL5, si è cercato di comprendere quali potessero essere i substrati da essa fosforilati. Mari e colleghi sostengono che CDKL5 fosforili MeCP2 (Mari, Azimonti et al. 2005), mentre Lin e colleghi smentiscono questa affermazione, sostenendo che hCDKL5 non fosforili direttamente MeCP2, ma interagisca con esso a livello di un complesso multiproteico. Una terza ipotesi (Kameshita, Sekiguchi et al. 2008) indica che il target di fosforilazione di hCDKL5 è la DNMT1, presente a livello di un complesso di repressione della cromatina (Lin, Franco et al. 2005). Per comprendere se le mutazioni a carico del dominio chinamico alterino in qualche modo anche la localizzazione subcellulare della proteina, sono stati eseguiti degli esperimenti di imaging su cellule viventi: sulla base dei dati di imaging, è stato osservato che la localizzazione dei due mutanti C152F e R175S appare peculiare (figura 23): il nucleo è visibilmente più fluorescente del citoplasma, con rapporti di fluorescenza che sono, in entrambi i mutanti, notevolmente superiori a 1. Si osserva inoltre una marcata fluorescenza a livello dei nucleoli, che appaiono più fluorescenti del resto del nucleoplasma. Tramite RICS è stato effettuato un confronto tra nucleo e citoplasma. Il coefficiente D nel nucleo ($1,45 \mu\text{m}^2/\text{s}$ per il mutante C152F e $1,30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nel caso del mutante R175S) è simile in entrambi i casi, ed è visibilmente più elevato del coefficiente nel citoplasma ($0,69 \mu\text{m}^2/\text{s}$ per il C152F, $0,68 \mu\text{m}^2/\text{s}$ per il R175S). Sono stati confrontati a coppie i due valori di D nel nucleo dei due mutanti mediante test t di Student e non sono

risultati significativamente diversi tra loro, con $p > 0,05$. Lo stesso confronto è stato fatto per i due coefficienti misurati a livello del citoplasma, e il risultato ottenuto è stato il medesimo. I due mutanti sono dunque sovrapponibili.

In entrambi i mutanti si osserva una situazione molto simile a quella osservata per la proteina wild type: la proteina diffonde più rapidamente nel nucleo rispetto a quanto fa nel citoplasma. Questa situazione è compatibile sia con il ruolo citoplasmatico di hCDKL5 nella morfogenesi dendritica ipotizzato da Chen e colleghi (Chen, Zhu et al. 2010) sia con i ruoli nucleari proposti.

In una seconda fase è stata analizzata la diffusività a livello dei nucleoli, paragonandola al resto del nucleoplasma (vedi figura 36). Da questa analisi emerge che la diffusione delle proteine mutanti nei nucleoli è drasticamente più lenta se comparata con la diffusività nel resto del nucleoplasma. Il D nei nucleoli risulta pari a $0,81 \mu\text{m}^2/\text{s}$ per entrambi i mutanti; il D nel nucleoplasma è pari a $2,02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nel caso del mutante C152F, e a $2,06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nel caso del mutante R175S. Questi dati portano a concludere che i mutanti hCDKL5 C152F e R175S mostrano una mobilità nei nucleoli drasticamente inferiore a quella del nucleoplasma. Una possibile spiegazione a tale evidenza potrebbe risiedere nel fatto che le due mutazioni puntiformi potrebbero portare ad un guadagno di funzione della proteina, che potrebbe quindi svolgere un ruolo alternativo a livello dei nucleoli. Tale ruolo potrebbe a sua volta essere alla base delle alterazioni patologiche che si riscontrano nei pazienti affetti portatori di queste mutazioni. Ricciardi e colleghi hanno dimostrato la presenza della

proteina wild type a livello delle speckles e sostengono che in alcuni casi questa localizzi anche nei nucleoli. Secondo questi autori hCDKL5 interagisce con numerosi fattori di splicing e snRNP (come SC35 e Sm) a livello delle speckles, causandone una loro mobilitazione verso siti di splicing. Inoltre Ricciardi e colleghi osservano che l'overespressione della proteina mutante R175S induce un disassemblamento delle speckles, in modo più lieve di quanto osservato nel caso dell'overespressione della proteina wild type (Ricciardi, Kilstrup-Nielsen et al. 2009).

La mislocalizzazione a livello dei nucleoli da noi osservata nei mutanti C152F ed R175S potrebbe essere causata da un'aumentata affinità di questi mutanti per alcuni snoRNA e alcune snoRNP deputati alla modificazione dell'RNA ribosomale. Questo potrebbe in primo luogo indurre un'alterazione dei normali meccanismi di splicing a cui hCDKL5 partecipa, e inoltre causare una parziale esclusione della proteina dal resto del nucleo, alterando alcuni dei pathway in cui la proteina è coinvolta. L'alterazione dei meccanismi di splicing o degli altri pathway nucleari potrebbero essere alla base del fenotipo mostrato dalle pazienti portatrici delle mutazioni C152F e R175S. Queste evidenze non sono state approfondite e necessitano di ulteriori analisi.

In conclusione, gli esperimenti di imaging e di spettroscopia di fluorescenza hanno permesso di dimostrare che la proteina hCDKL5 riveste importanti ruoli sia nel nucleo che nel citoplasma, e che la presenza del dominio carbossi-terminale e il normale funzionamento del dominio chinasi sono di fondamentale importanza per il corretto funzionamento della proteina.

BIBLIOGRAFIA

Amir, R. E., I. B. Van den Veyver, et al. (1999). "Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2." Nat Genet **23**(2): 185-188.

Archer, H. L., S. D. Whatley, et al. (2006). "Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients." J Med Genet **43**(5): 451-456.

Ariani, F., G. Hayek, et al. (2008). "FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome." Am J Hum Genet **83**(1): 89-93.

Armstrong, D., J. K. Dunn, et al. (1995). "Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome." J Neuropathol Exp Neurol **54**(2): 195-201.

Asaka, Y., D. G. Jugloff, et al. (2006). "Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the Mecp2-null mouse model of Rett syndrome." Neurobiol Dis **21**(1): 217-227.

Bauman, M. L., T. L. Kemper, et al. (1995). "Microscopic observations of the brain in Rett syndrome." Neuropediatrics **26**(2): 105-108.

Bertani, I., L. Rusconi, et al. (2006). "Functional consequences of mutations in CDKL5, an X-linked gene involved in infantile spasms and mental retardation." J Biol Chem **281**(42): 32048-32056.

Bienvenu, T., A. Carrie, et al. (2000). "MECP2 mutations account for most cases of typical forms of Rett syndrome." Hum Mol Genet **9**(9): 1377-1384.

Bird, A. P. (1995). "Gene number, noise reduction and biological complexity." Trends Genet **11**(3): 94-100.

Blue, M. E., S. Naidu, et al. (1999). "Altered development of glutamate and GABA receptors in the basal ganglia of girls with Rett syndrome." Exp Neurol **156**(2): 345-352.

Boyes, J. and A. Bird (1992). "Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein." EMBO J **11**(1): 327-333.

Bredenkamp, N., C. Seoighe, et al. (2007). "Comparative evolutionary analysis of the FoxG1 transcription factor from diverse vertebrates identifies conserved recognition sites for microRNA regulation." Dev Genes Evol **217**(3): 227-233.

Cardarelli, F., M. Serresi, et al. (2007). "In vivo study of HIV-1 Tat arginine-rich motif unveils its transport properties." Mol Ther **15**(7): 1313-1322.

Carouge, D., L. Host, et al. (2010). "CDKL5 is a brain MeCP2 target gene regulated by DNA methylation." Neurobiol Dis **38**(3): 414-424.

Chahrour, M. and H. Y. Zoghbi (2007). "The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology." Neuron **56**(3): 422-437.

Cheadle, J. P., H. Gill, et al. (2000). "Long-read sequence analysis of the MECP2 gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location." Hum Mol Genet **9**(7): 1119-1129.

Chen, Q., Y. C. Zhu, et al. (2010). "CDKL5, a protein associated with rett syndrome, regulates neuronal morphogenesis via Rac1 signaling." J Neurosci **30**(38): 12777-12786.

Chen, R. Z., S. Akbarian, et al. (2001). "Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice." Nat Genet **27**(3): 327-331.

Chen, W. G., Q. Chang, et al. (2003). "Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2." Science **302**(5646): 885-889.

Coy, J. F., Z. Sedlacek, et al. (1999). "A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression." Hum Mol Genet **8**(7): 1253-1262.

D'Esposito, M., N. A. Quaderi, et al. (1996). "Isolation, physical mapping, and northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2." Mamm Genome **7**(7): 533-535.

Dani, V. S., Q. Chang, et al. (2005). "Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12560-12565.

Dastidar, S. G., P. M. Landrieu, et al. (2011). "FoxG1 promotes the survival of postmitotic neurons." J Neurosci **31**(2): 402-413.

Digman, M. A., C. M. Brown, et al. (2005). "Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope." Biophys J **89**(2): 1317-1327.

Dragich, J., I. Houwink-Manville, et al. (2000). "Rett syndrome: a surprising result of mutation in MECP2." Hum Mol Genet **9**(16): 2365-2375.

Fichou, Y., J. Nectoux, et al. (2011). "An isoform of the severe encephalopathy-related CDKL5 gene, including a novel exon with extremely high sequence conservation, is specifically expressed in brain." J Hum Genet **56**(1): 52-57.

Georgel, P. T., R. A. Horowitz-Scherer, et al. (2003). "Chromatin compaction by human MeCP2. Assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation." J Biol Chem **278**(34): 32181-32188.

Goldberg, A. P., E. M. Geltman, et al. (1983). "Therapeutic benefits of exercise training for hemodialysis patients." Kidney Int Suppl **16**: S303-309.

Hagberg, B., J. Aicardi, et al. (1983). "A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases." Ann Neurol **14**(4): 471-479.

Hagberg, B. A. and O. H. Skjeldal (1994). "Rett variants: a suggested model for inclusion criteria." Pediatr Neurol **11**(1): 5-11.

Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-514.

Hanashima, C., S. C. Li, et al. (2004). "Foxg1 suppresses early cortical cell fate." Science **303**(5654): 56-59.

Jan, M. M., J. M. Dooley, et al. (1999). "Male Rett syndrome variant: application of diagnostic criteria." Pediatr Neurol **20**(3): 238-240.

Jones, P. L., G. J. Veenstra, et al. (1998). "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." Nat Genet **19**(2): 187-191.

Journel, H., J. Melki, et al. (1990). "Rett phenotype with X/autosome translocation: possible mapping to the short arm of chromosome X." Am J Med Genet **35**(1): 142-147.

Kalscheuer, V. M., J. Tao, et al. (2003). "Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation." Am J Hum Genet **72**(6): 1401-1411.

Kameshita, I., M. Sekiguchi, et al. (2008). "Cyclin-dependent kinase-like 5 binds and phosphorylates DNA methyltransferase 1." Biochem Biophys Res Commun **377**(4): 1162-1167.

- Kishi, N. and J. D. Macklis (2004). "MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions." Mol Cell Neurosci **27**(3): 306-321.
- Kokura, K., S. C. Kaul, et al. (2001). "The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression." J Biol Chem **276**(36): 34115-34121.
- Lamond, A. I. and D. L. Spector (2003). "Nuclear speckles: a model for nuclear organelles." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(8): 605-612.
- Lin, C., B. Franco, et al. (2005). "CDKL5/Stk9 kinase inactivation is associated with neuronal developmental disorders." Hum Mol Genet **14**(24): 3775-3786.
- Luikenhuis, S., E. Giacometti, et al. (2004). "Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6033-6038.
- Madge, D. (1976). "Chemical kinetics and fluorescence correlation spectroscopy." Q Rev Biophys **9**(1): 35-47.
- Marchi, M., A. Guarda, et al. (2007). "Spatio-temporal dynamics and localization of MeCP2 and pathological mutants in living cells." Epigenetics **2**(3): 187-197.
- Mari, F., S. Azimonti, et al. (2005). "CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome." Hum Mol Genet **14**(14): 1935-1946.
- Mnatzakanian, G. N., H. Lohi, et al. (2004). "A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome." Nat Genet **36**(4): 339-341.

Montini, E., G. Andolfi, et al. (1998). "Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region." Genomics **51**(3): 427-433.

Murphy, D. B., S. Wiese, et al. (1994). "Human brain factor 1, a new member of the fork head gene family." Genomics **21**(3): 551-557.

Nan, X., F. J. Campoy, et al. (1997). "MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin." Cell **88**(4): 471-481.

Nan, X., R. R. Meehan, et al. (1993). "Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2." Nucleic Acids Res **21**(21): 4886-4892.

Nan, X., P. Tate, et al. (1996). "DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2." Mol Cell Biol **16**(1): 414-421.

Nectoux, J., D. Heron, et al. (2006). "Maternal origin of a novel C-terminal truncation mutation in CDKL5 causing a severe atypical form of Rett syndrome." Clin Genet **70**(1): 29-33.

Neul, J. L., W. E. Kaufmann, et al. (2010). "Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature." Ann Neurol **68**(6): 944-950.

Nomura, Y. (2005). "Early behavior characteristics and sleep disturbance in Rett syndrome." Brain Dev **27 Suppl 1**: S35-S42.

Percy, A. K., J. L. Neul, et al. (2010). "Rett syndrome diagnostic criteria: lessons from the Natural History Study." Ann Neurol **68**(6): 951-955.

Regad, T., M. Roth, et al. (2007). "The neural progenitor-specifying activity of FoxG1 is antagonistically regulated by CKI and FGF." Nat Cell Biol **9**(5): 531-540.

Ricciardi, S., C. Kilstrup-Nielsen, et al. (2009). "CDKL5 influences RNA splicing activity by its association to the nuclear speckle molecular machinery." Hum Mol Genet **18**(23): 4590-4602.

Rosas-Vargas, H., N. Bahi-Buisson, et al. (2008). "Impairment of CDKL5 nuclear localisation as a cause for severe infantile encephalopathy." J Med Genet **45**(3): 172-178.

Rossow, M. J., J. M. Sasaki, et al. (2010). "Raster image correlation spectroscopy in live cells." Nat Protoc **5**(11): 1761-1774.

Roth, M., B. Bonev, et al. (2010). "FoxG1 and TLE2 act cooperatively to regulate ventral telencephalon formation." Development **137**(9): 1553-1562.

Rusconi, L., L. Salvatoni, et al. (2008). "CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail." J Biol Chem **283**(44): 30101-30111.

Schanen, N. C., E. J. Dahle, et al. (1997). "A new Rett syndrome family consistent with X-linked inheritance expands the X chromosome exclusion map." Am J Hum Genet **61**(3): 634-641.

Shahbazian, M. D., B. Antalffy, et al. (2002). "Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation." Hum Mol Genet **11**(2): 115-124.

Steffenburg, U., G. Hagberg, et al. (2001). "Epilepsy in a representative series of Rett syndrome." Acta Paediatr **90**(1): 34-39.

Tao, J., K. Hu, et al. (2009). "Phosphorylation of MeCP2 at Serine 80 regulates its chromatin association and neurological function." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4882-4887.

Tao, J., H. Van Esch, et al. (2004). "Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation." Am J Hum Genet **75**(6): 1149-1154.

Thomas, G. H. (1996). "High male:female ratio of germ-line mutations: an alternative explanation for postulated gestational lethality in males in X-linked dominant disorders." Am J Hum Genet **58**(6): 1364-1368.

Tian, Y., M. M. Martinez, et al. (2011). "Fluorescence correlation spectroscopy: a review of biochemical and microfluidic applications." Appl Spectrosc **65**(4): 115A-124A.

Wakefield, R. I., B. O. Smith, et al. (1999). "The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA." J Mol Biol **291**(5): 1055-1065.

Weaving, L. S., J. Christodoulou, et al. (2004). "Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation." Am J Hum Genet **75**(6): 1079-1093.

Willard, H. F. and B. D. Hendrich (1999). "Breaking the silence in Rett syndrome." Nat Genet **23**(2): 127-128.

Williamson, S. L., L. Giudici, et al. (2011). "A novel transcript of cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) has an alternative C-terminus and is the predominant transcript in brain." Hum Genet.

Xiang, F., Z. Zhang, et al. (1998). "Chromosome mapping of Rett syndrome: a likely candidate region on the telomere of Xq." J Med Genet **35**(4): 297-300.

Yao, J., E. Lai, et al. (2001). "The winged-helix protein brain factor 1 interacts with groucho and hes proteins to repress transcription." Mol Cell Biol **21**(6): 1962-1972.

Yasui, D. H., S. Peddada, et al. (2007). "Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19416-19421.

Young, J. I., E. P. Hong, et al. (2005). "Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(49): 17551-17558.

Yu, F., J. Thiesen, et al. (2000). "Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2." Nucleic Acids Res **28**(10): 2201-2206.

Zappella, M., I. Meloni, et al. (2001). "Preserved speech variants of the Rett syndrome: molecular and clinical analysis." Am J Med Genet **104**(1): 14-22.

Zhou, Z., E. J. Hong, et al. (2006). "Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation." Neuron **52**(2): 255-269.

Ringraziamenti

È stata lunga, è stata dura, ma ce l'ho fatta. Ci sono tante persone che dovrei ringraziare, che hanno fatto parte di questa mia avventura da quando, tre anni fa, spaurita e sprovvista, mi sono trasferita a Pisa, ma per non annoiare nessuno mi limiterò alle più importanti.

Vorrei ringraziare tutte le persone dell' istituto di Neuroscienze del CNR di Pisa e il gruppo della Scuola Normale Superiore, che mi hanno permesso di svolgere la tesi presso le loro strutture.

Ringrazio il Dr. Mario Costa, che mi ha accolto nel suo gruppo in modo caloroso, mi ha insegnato tanto e ha accresciuto in me l'interesse per la Biologia, facendomi sempre sentire parte integrante del gruppo; grazie di cuore a Laura, che mi ha seguito passo passo in questo bellissimo periodo di tesi e che non mi ha mai perso la pazienza per i disastri che ho combinato, rendendo ogni esperimento più allegro e spensierato, tra le note di *Bohemian Rhapsody* e di *Help!*; grazie ad Anna, che non mi ha mai negato il suo aiuto ogni volta che ne ho avuto bisogno e non ha mai mancato di farmi sentire a mio agio.

Grazie al Prof. Massimiliano Andreazzoli e al Dr. Matteo Caleo, per i preziosi consigli che mi hanno dato durante la stesura della tesi.

Grazie al Dr. Francesco Cardarelli, che mi ha insegnato a padroneggiare alcune delle tecniche impiegate in questa tesi ed è stato sempre disponibile, e ai responsabili del NEST (National Enterprise for nanoScience and nanoTechnology), che mi hanno consentito di svolgere parte dei miei esperimenti presso la loro struttura.

E ora veniamo alla parte sdolcinata...

Grazie alla mia famiglia, a mia mamma, mio babbo e mio fratello, che mi hanno sempre sostenuto, economicamente ma soprattutto moralmente, aiutandomi a superare i miei momenti di difficoltà e partecipando alle mie gioie e ai miei successi.

Grazie a Tiziano, che ha sempre condiviso con me l'interesse per le Scienze, con interminabili chiacchierate, e che ha saputo capire che questo lavoro comporta numerosi sacrifici.

Grazie a Simona e Simona, una dalla Sardegna, l'altra dalla Sicilia, amiche carissime, preziose consigliere, sempre presenti e disponibili con il loro affetto.

Grazie alle mie coinquiline, che hanno dovuto sopportare i miei sbalzi d'umore, le mie lamentele e le mie sfuriate, ma con le quali ho condiviso tanti momenti divertenti.

Infine un grazie sincero a tutti coloro che non posso elencare ora (ci vorrebbero troppe pagine e le copisterie sono carissime!).